

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní
identifikace, biologická aktivita. I**
**Alkaloids of Amaryllidaceae family: isolation, structural
identification, biological activity. I**

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2017

Alice Dohnalová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.

V Hradci Králové, květen 2017

.....
podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vstřícný přístup, ochotu, rady a poskytnuté odborné materiály pro zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Breiterové za velkou pomoc během samotné experimentální práce. Zároveň děkuji všem, kteří se podíleli na určování struktury, měření biologických aktivit či interpretaci výsledků, a to nejen na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. V neposlední řadě patří poděkování celému kolektivu na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a kolegiální.

Tato práce byla podpořena projektem SVV 260 292.

OBSAH

1 ÚVOD	6
2 CÍL PRÁCE.....	8
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1 Čeleď Amaryllidaceae.....	9
3.2 Rod <i>Narcissus</i>	10
3.3 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biosyntéza.....	12
3.4 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich protinádorová aktivita	15
3.4.1 Základní cytotoxické mechanismy působení Amaryllidaceae alkaloidů.....	15
3.4.2 Lykorinový typ.....	17
3.4.3 Krininový typ	22
3.4.4 Narciklasinový typ	27
3.4.5 Tazettinový typ	32
3.5 Amaryllidaceae alkaloidy využitelné v terapii Alzheimerovy choroby	33
3.6 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich další biologická aktivita.....	35
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
4.1 Všeobecné postupy.....	37
4.1.1 Destilace a odpařování.....	37
4.1.2 Sloupcová chromatografie	37
4.1.3 Příprava desek pro preparativní TLC	37
4.1.4 Preparativní TLC.....	37
4.1.5 Detekce biologicky aktivních látek na chromatografických deskách.....	37
4.2 Materiál a vybavení	38
4.2.1 Rozpouštědla	38
4.2.2 Chemikálie	38
4.2.3 Použité mobilní fáze.....	38
4.2.4 Chromatografické adsorbenty	38
4.3 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu z rostliny <i>Narcissus</i> cv. PROFESSOR EINSTEIN	39
4.3.1 Biologický materiál	39
4.3.2 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu	39
4.4 Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu.....	40
4.4.1 Kolona	40
4.5 Zpracování frakce č. 17.....	44
4.6 Metody použití pro identifikaci alkaloidů	48

4.6.1 GC/MS analýza	48
4.6.2 Nukleární magnetická rezonance	48
4.6.3 Optická otáčivost.....	48
4.7 Spektrum biologické aktivity a její stanovení	49
4.7.1 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity vůči AChE/ BuChE.....	49
4.7.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase (POP)	51
4.7.3 Stanovení antimalarické aktivity	51
4.7.4 Stanovení cytotoxické aktivity.....	51
5 VÝSLEDKY.....	53
5.1 Strukturní analýza epimaritidinu.....	53
5.1.1 MS studie epimaritidinu	53
5.1.2 NMR studie epimaritidinu	54
5.1.3 Optická otáčivost epimaritidinu	54
5.1.4 Biologická aktivita epimaritidinu ve vztahu k Alzheimerově chorobě	55
5.1.6 Antimalarická aktivita epimaritidinu	55
5.1.7 Cytotoxická aktivita epimaritidinu	55
6 DISKUSE	56
7 LITERATURA	58
8 SEZNAM ZKRATEK.....	63

1 ÚVOD

Zmínky o použití přírodních sloučenin a bylinných extraktů k léčbě různých onemocnění jsou již po tisíce let v Ayurvédské medicíně, která sahá do 3000 př.n.l. Rostliny jako celek nebo sloučeniny z nich získané byly použity jako léčiva v asijských zemích nebo v Řecku již od dávných časů, a právě z nich byl vyvinout pozoruhodný počet moderních léků. Pojem „Green drug“ je vysvětlován jako čištěná fytochemická látka izolovaná z rostlin, a to s nepatrnou chemickou modifikací struktury pro přímé použití nebo bez ní. Tyto zelené léky vedly k vývoji léčiv jako je kurkumin, paklitaxel či vinkristin. Úspěchy bylinné medicíny silně naznačují interakci mezi bioaktivními sloučeninami rostlin a klíčovými biochemickými procesy v lidském těle. Rostoucí výskyt nemocí jako je rakovina, podnítil vědce po celém světě, aby se pozorně zaměřili na patofyziologii a prevenci onemocnění, což vede k urychlené výzkumné činnosti v posledních třech desetiletích [1].

Rakovina je stále rostoucí zdravotní problém po celém světě v souvislosti s nárůstem urbanizace, změnami v životním prostředí a životním stylu. Mezi nepřenosnými chorobami je druhou nejčastější příčinou úmrtí po kardiovaskulárních onemocněních [1]. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) bude nárůst nových případů rakoviny stoupat z 14 milionů (r. 2012) na 24 milionů (r. 2035) [2]. Ve většině případů onkologických pacientů je úmrtí způsobeno v důsledku necitlivosti rakovinných buněk na léčbu, metastází či šířením rakovinných buněk do životně důležitých orgánů. Standardní léčba zahrnuje chirurgický zákrok, radioterapii nebo chemoterapii. Tato léčba ale poškozuje zdravé tkáně, což vede k řadě nežádoucích účinků. V důsledku toho je značné úsilí vloženo do hledání a vývoje takových sloučenin, které by byly schopné selektivně cílit pouze na nádorové buňky. Mezi různými přírodními zdroji, které byly studovány jako potenciálně využitelné v léčbě rakoviny, jsou obzvláště slibné rostliny z čeledi Amaryllidaceae [3].

Čeleď Amaryllidaceae zahrnuje cibulovité, nádherně kvetoucí rostliny pojmenované po rodu *Amaryllis* [4]. Hlavní sloučeniny, které můžeme v těchto rostlinách objevit, jsou alkaloidy, které jsou známé pro své různé chemické struktury a širokou škálu biologických aktivit. Z těchto účinků můžeme zmínit antiproliferativní, protinádorovou/cytotoxickou, inhibici acetylcholinesterázy,

analgetickou, antibakteriální, antivirovou, antifungální či antimalarickou aktivitu [5, 6]. Intenzivní výzkum v posledních desetiletích, jež se zabývá izolací, určováním struktury, analýzou složení ve vztahu k biologické aktivitě, totální syntézou a farmakologickou charakterizací má osvětlit jejich obrovský potenciál [6]. Do dnešní doby bylo izolováno a strukturně popsáno více než 500 Amaryllidaceae alkaloidů [7]. Tyto sloučeniny jsou příkladem široké rozmanitosti sekundárních metabolitů s velkým terapeutickým příslibem [8]. Galanthamin je ukázkovým příkladem Amaryllidaceae alkaloidů. Jedná se o jeden ze tří základních léků používaných pro léčbu Alzheimerovy choroby [8]. Použití galanthaminu k léčbě jiných chorob, kde se projevují zhoršené kognitivní funkce, nebo ve vztahu k zotavení ze závislosti, jsou aktivní oblastí lékařského výzkumu [4]. Mnoho Amaryllidaceae alkaloidů je hodnoceno pro svou protinádorovou/cytotoxickou aktivitu. Ačkoli cytotoxické účinky jsou často pozorovány u alkaloidů v celé čeledi, nejaktivnější složky se nacházejí v rámci lykorinového a krininového strukturního typu a u tzv. fenanthridinových derivátů [9].

Mnoho biologicky aktivních přírodních látek, které se staly předmětem zájmu pro farmaceutické využití, je k dispozici pouze z přírodních zdrojů a v omezeném množství. Výroba z původních rostlinných druhů může být ekonomicky náročná a složitá zejména tehdy, pokud rostliny produkují jen malé množství požadované sloučeniny nebo je daný druh obtížně dostupný [4]. V zájmu vědců je tedy nalézt takovou cestu, která bude produkovat dostatečné množství terapeuticky využitelných alkaloidů. Jedna z možností je jejich příprava syntetickou cestou.

2 CÍL PRÁCE

Náplní této práce bylo:

- 1) Zpracování 34 kg čerstvých cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN a příprava ethanolického extraktu.
- 2) Příprava alkaloidního extraktu a jeho chromatografické zpracování.
- 3) Izolace alespoň jednoho alkaloidu v čistém stavu, jeho strukturní identifikace.
- 4) Příprava látek pro biologické studie.
- 5) Zpracování výsledků a sepsání diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Čeleď Amaryllidaceae

Rostlinná čeleď Amaryllidaceae patří do řádu *Amaryllidales*, kde můžeme nalézt mimo jiné i další farmaceuticky významné čeledi – Hyacinthaceae, Alliaceae či Agavaceae [10].

Amarylkovité rostliny jsou vytrvalé rostliny s oddenky, hlízkami nebo cibulemi. Jejich listy jsou čárkovité a to buď přizemní, nebo lodyžní. Oboupohlavné květy jsou opatřeny spodním semeníkem a situovány jsou buď jednotlivě, nebo do šroubovitých květenství. Obvyklým plodem je bobule nebo tobolka [10].

Tato čeleď zahrnuje kolem 75 rodů a 1100 druhů, které se vyskytují v tropických a teplých oblastech napříč světem. Tyto rostliny jsou používány po tisíce let jako přírodní medikamenty. Přírodní produkty hrají velmi významnou roli v objevování a vývoji nových léků pro léčbu lidských onemocnění. To je obzvláště patrné v oblasti rakoviny, kde více než 60 % léčiv patří mezi přírodní produkty. Rostliny této čeledi jsou již dlouho známé pro své léčivé a toxické vlastnosti a v důsledku toho byly provedeny pokusy izolace látek zodpovědných za protinádorovou aktivitu [11]. První datovaná zmínka o terapeutickém účinku je ze 4. století př. n. l., kdy Hippokrates doporučoval k léčbě děložního nádoru alkaloidní extrakt na olejové bázi z rostliny *Narcissus poeticus* L. [12] Stejně tak činil i Pedanius Dioscorides (1. století) [6]. Tato tradice byla udržována i v průběhu středověku, například ve Francii ji využíval známý chirurg Henri de Mondeville (14. století) [6]. Jiným příkladem je *Hymenocallis littoralis*, který byl po staletí známým lékem rakoviny v tradiční medicíně Mayů v Jižní Americe [9].

Rostliny patřící do čeledi Amaryllidaceae se také pěstují pro okrasné účely. Na území České republiky můžeme nalézt zástupce rodů *Narcissus* (narcisy), *Galanthus* (sněženky) a *Leucojum* (bledule). *Leucojum aestivum* patří mezi zástupce rodu *Leucojum*, který je v současné době využíván jako průmyslový zdroj galanthaminu ve východní Evropě [13]. Mezi další zajímavé rody čeledi Amaryllidaceae se řadí *Amaryllis*, *Haemanthus* či *Eucharis*. Rod *Eucharis* pochází z deštných pralesů kolumbijských And, kde můžeme nalézt 17 druhů. Z etnobotanického hlediska je zajímavostí, že rozdrčené cibule *Eucharis* byly používány místními domorodci na zábaly vředů a nádorů [14]. Za zmínku stojí určitě

i rody *Hippeastrum*, *Nerine*, *Zephyranthes* nebo rod *Lycoris*, který je znám nejen pro své krásné květy, ale i pro léčivé účinky. Jako léčivé byliny se již po tisíce let používají v Číně, protože právě východní Asie je původní domovinou tohoto rodu [15]. V neposlední řadě jsou tu ještě rody *Crinum*, *Pancratium* nebo rod *Clivia*, který zahrnuje 4 endemické druhy v jižní Africe a všechny jsou využity v tradiční medicíně [16].

3.2 Rod *Narcissus*

Rostliny patřící do rodu *Narcissus* jsou jednoděložné, vytrvalé cibuloviny, které mají poměrně krátké růstové období. Cibule narcisu je složena ze 4 – 5 dužnatých suknic, uprostřed nichž jsou zárodky listů a stonku s květem. Může být více nebo méně kulovitá, někdy protáhlá ke špičce nebo ze strany zploštělá. U různých druhů se od sebe liší tvarem, velikostí, charakterem a barvou slupky. Na rozdíl od tulipánu se cibule narcisu každoročně nevyčerpává a neodumírá, ale narůstá vytvářením nové vrstvy suknic. Dceřiné cibule se vytvářejí po stranách matečné cibule a dorůstají během jednoho až tří let. V určité fázi vývinu se tyto cibule samovolně oddělují. Listy jsou řemenovité nebo čárkovité a obvykle po celé délce stejně široké. Stonek je bezlistý, na průřezu kulatý až téměř plochý. Květy jsou na stonku jednotlivě nebo v několikakvětých okolících. Květ má šest okvětních lístků, které jsou úzké, jindy velmi široké, oválné a překrývající se. Uprostřed květu je rozmanitě utvářená pakorunka, která je buď docela malá a plochá, nebo je dlouze trubkovitá, někdy na okraji široce rozevřená a vroubkovaná. Barva okvětních lístků je nejčastěji bílá nebo žlutá a to v různých odstínech. Na druhou stranu barva pakorunky může být pestřejší a kromě bílé a žluté může mít odstíny oranžové až červené či růžové.

Název *Narcissus* je odvozený od řeckého slova „narkos“, což znamená omamující podle jemné opojné vůně *Narcissus poeticus* (Obr. 1/A) [17].

Tento rod zahrnuje podle různých autorů 50 – 180 druhů s mnoha mezidruhovými hybridy a polyploidních forem [18]. Zaujímají široké geografické rozšíření a to v různých mikrostaništích, což vysvětluje jejich obrovskou morfologickou variabilitu [18]. Narcisy jsou původem rostlinami severní polokoule. Nejvíce druhů je domácích v Evropě, příkladem jsou Švýcarsko a jižní Francie [17]. Vůbec největší rozmanitost rostlin druhu *Narcissus* se nachází na Pyrenejském

poloostrově, kde se vyskytuje až 90 % všech druhů [18]. Jejich stanoviště se pohybují od nížin až po horské lokality včetně luk a pastvin, křovinných míst, lesů, říčních břehů a skalních štěrbin [18]. *Narcissus poeticus* (Obr. 1/A) a *Narcissus pseudonarcissus* (Obr. 1/B) se rozšířily i do střední Evropy. Nejseverněji se vyskytuje *Narcissus pseudonarcissus*, a to až na britském souostroví. Narcisy můžeme nalézt i na africkém pobřeží Středozemního moře, nejjižněji roste *Narcissus tazetta* (Obr. 1/C), a to na Kanárských ostrovech. Tento druh má vůbec největší areál rozšíření, můžeme ho nalézt v Asii, Číně a Japonsku.



Obrázek 1: Vybrané druhy *Narcissus* sp. [19-21]

Narcisy, stejně jako jiné rostliny čeledi Amaryllidaceae, se historicky používají v lidovém léčitelství v léčbě karcinomů. Kromě uvedených poznatků stojí za zmínku lokální protirakovinné použití extraktů z *N. poeticus* a *N. pseudonarcissus*, které zaznamenal v prvním století římský přírodovědec Gaius Plinius Secundus, známý jako Plinius Starší. Bible odkazuje na středozevní druh *N. tazetta* s dlouhou historií v použití proti rakovině. Nakonec i žádosti o olej pocházející z rostlin rodu *Narcissus* na léčbu rakoviny byly ve středověku nejen v Číně, ale i ve Střední Americe a arabské medicíně [22].

V experimentální části této práce jsem pracovala na přípravě alkaloidního extraktu, jeho chromatografickém dělení a izolaci alkaloidů z *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. Tento kultivar byl vybrán jako potenciálně nadějná rostlina s obsahem mnoha biologicky aktivních látek na základě předchozího experimentu, který byl proveden na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, FaF UK, HK. Původ tohoto kultivaru není znám. Ukázka květu je na obrázku (Obr. 2).

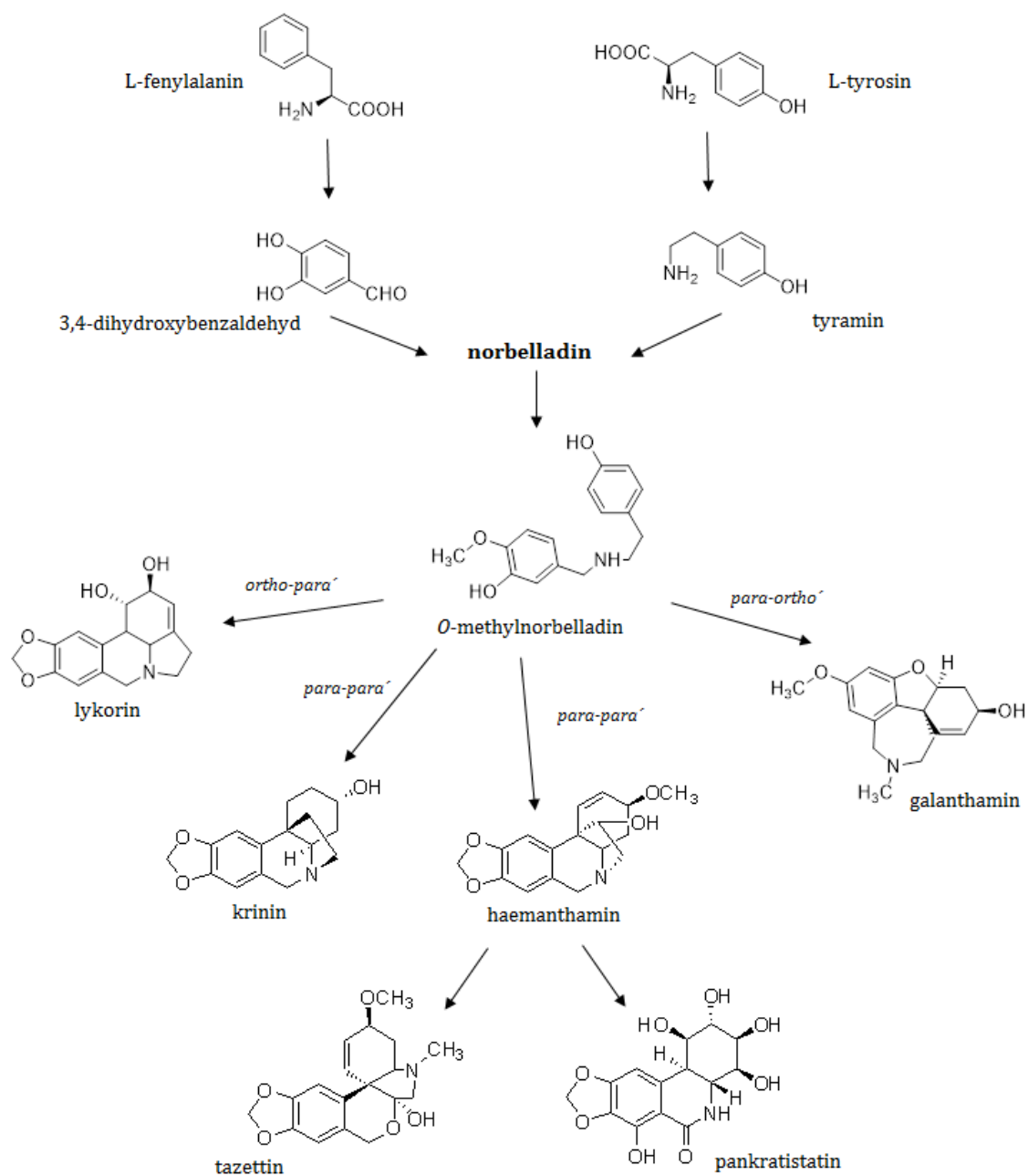


Obrázek 2: *Narcissus* cv. *PROFESSOR EINSTEIN* [23]

3.3 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biosyntéza

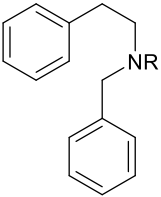
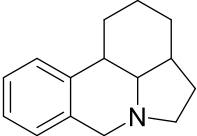
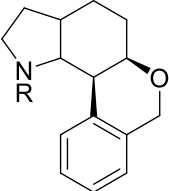
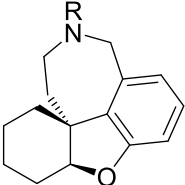
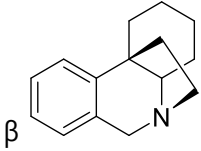
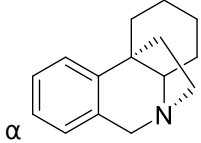
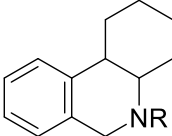
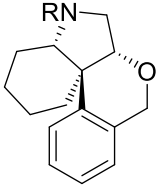
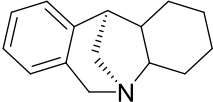
Amaryllidaceae alkaloidy se většinou vyskytují v celé rostlině. V největším množství jsou obsaženy v cibulích, kde slouží jako ochrana sacharidových zdrojů rostliny před býložravci a mikroorganismy [4, 7]. Dnes je známo již přes 500 amaryllidových alkaloidů, které byly izolovány v posledních třech desetiletích. Celkem je popsáno cca 18 strukturních typů, z nichž 9 je hlavních (Tab. 1) [24]. U těchto sloučenin byla prokázána řada biologických aktivit, u jednotlivých alkaloidů je ovšem velmi různá. Zájem o Amaryllidaceae alkaloidy pochází především z použití alkaloidu galanthaminu v terapii Alzheimerovy choroby, kde působí jako inhibitor acetylcholinesterázy [12]. Mnohé z nich také vykazují protinádorovou aktivitu, která se dnes řadí mezi nejvýznamnější. U některých byla prokázána rovněž i aktivita antibakteriální, antivirová, antimalarická či antiparazitická [12].

Specifickou biosyntetickou cestou amaryllidových alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta (Obr. 3), která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu [7]. L-tyrosin se mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd [7]. Reakcí tyraminu a 3,4-dihydroxybenzaldehydu vzniká společný prekurzor 4'-O-methylnorbelladin.



Obrázek 3: Norbelladinová biosyntetická cesta Amaryllidaceae alkaloidů

Tabulka 1: Strukturní typy alkaloidů v čeledi Amaryllidaceae

Strukturní typ	Základní skelet strukturního typu	Hlavní zástupce	Rod
Belladinový		Norbelladin	<i>Crinum</i> [25], <i>Galanthus</i> [26], <i>Nerine</i> [27]
Lykorinový		Lykorin	<i>Lycoris</i> [28], <i>Zephyrantes</i> [3], <i>Crinum</i> [29]
Lykoreninový (Homolykorinový)		Homolykorin	<i>Clivia</i> [16], <i>Lycoris</i> [5], <i>Narcissus</i> [18]
Galanthaminový		Galanthamin	<i>Crinum</i> [25], <i>Galanthus</i> [26], <i>Leucojum</i> [30], <i>Lycoris</i> [15], <i>Narcissus</i> [18]
Krininový	 	Krinin Haemanthamin	<i>Zephyrantes</i> [3], <i>Hippeastrum</i> [9], <i>Crinum</i> [31, 32], <i>Boophane</i> [33]
Narciklasinový		Pankratistatin	<i>Narcissus</i> [18], <i>Hymenocallis</i> [31], <i>Pancratium</i> [34]
Tazettinový		Pretazettin Tazettin	<i>Clivia</i> [16], <i>Eucharis</i> [14], <i>Hippeastrum</i> [35], <i>Narcissus</i> [36]
Montaninový		Montanin	<i>Hippeastrum</i> [35]

Klíčovým krokem biosyntézy Amaryllidaceae alkaloidů je pak oxidativní cyklizace *O*-methylnorbelladinu třemi různými způsoby. Vznikají spojení *ortho* – *para*′, *para*′ – *para*′ a *para*′ – *ortho*′, což vede ke vzniku alkaloidů s různými typy skeletů [4]. Například alkaloidy galathaminového typu vznikají z prekursoru *O*-methylnorbelladinu a jeho oxidativní cyklizací s fenolem v poloze *para*′-*ortho*′ [4]. Komplexní síť enzymatických procesů, které působí mezi jednotlivými alkaloidními prekursory, vytváří spektrum sloučenin, které jsou velmi rozmanité nejen u jednotlivých druhů a kultivarů, ale i mezi jednotlivými tkáněmi v rámci rostliny [4]. U jednoho druhu se nachází několik dominantních látek a velké množství látek, které se objevují v nízkých koncentracích [4].

3.4 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich protinádorová aktivita

Je známo mnoho záznamů o historickém použití Amaryllidaceae alkaloidů v léčbě rakoviny. Typická je oblast Středomoří, kde jak již bylo zmíněno Hippokrates doporučoval léčbu karcinomu v oblasti dělohy prostřednictvím oleje z *Narcissus poeticus*. Využití účinků Amaryllidaceae alkaloidů pocházejících z rostlin *Amaryllis beladona*, *Boöphone disticha* a *Crinum delagoense* bylo známo i mezi Jihoafričany, kteří je využívali v tradiční medicíně k léčbě malignit [9]. Cytotoxické účinky byly zaznamenány u mnoha alkaloidů napříč celou čeledí Amaryllidaceae. Nejvíce účinné látky byly nalezeny v lykorinovém, krininovém a narciklasinovém strukturním typu [9]. Doposud bylo přes 200 těchto alkaloidů podrobena screeningovým testům s využitím různých nádorových buněk. Jako nejperspektivnější se ukázaly pankratiastatin a narciklasin [37]. Tyto alkaloidy jsou deriváty odvozené od fenanthridinu. Jedná se o polyhydroxylované sloučeniny, které se vyznačují unikátními farmakologickými vlastnostmi včetně vysoké účinnosti [37]. Jejich selektivita, dobrá snášenlivost pro pacienty a nízká toxicita ke zdravým buňkám jsou vlastnosti, které vedly ke značnému zájmu v klinické sféře s cílem zavedení do praxe [37].

3.4.1 Základní cytotoxické mechanismy působení Amaryllidaceae alkaloidů

Do dnešní doby bylo provedeno nespočet odborných studií o těchto látkách. V některých případech byl podrobně zkoumán i mechanismus účinku.

Studie, které byly provedeny v roce 1970, byly zaměřeny na interakce Amaryllidaceae alkaloidů s eukaryotními ribozomy [37]. Tyto buněčné orgány jsou komplexní struktury složené především z rRNA a proteinů. V největším zastoupení je nalezneme volně v cytoplazmě a u eukaryotických buněk i na povrchu hrubého endoplazmatického retikula. Nejvíce se uplatňují během procesu translace, při níž je syntetizován polypeptid. Ten vzniká poměrně složitým procesem z jednotlivých aminokyselin, mezi nimiž je vytvořena peptidová vazba. Právě tvorbu této peptidové vazby jsou schopny některé Amaryllidaceae alkaloidy inhibovat, a tak zabránit proteosyntéze. Mezi alkaloidy schopné tohoto procesu patří narciklasin, lykorin, pseudolykorin, haemathamin a pretazettin [37].

Mezi další mechanismus působení patří zásah do mitotického aparátu buněk. Nepříznivé působení se odráží především ve dvou fázích mitotického dělení, a to v metafázi a v profázi. Tento účinek byl pozorován u narciklasinu v rámci studie provedené v roce 1967 [37]. Byla to vůbec první studie *in vivo*, kdy se podařilo uplatnit Amaryllidaceae alkaloidy v procesu zastavení buněčného dělení u rakovinných buněk [37].

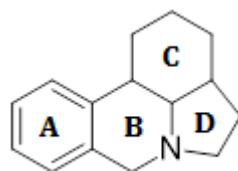
Zajímavá je i skutečnost, že některé Amaryllidaceae alkaloidy dokážou interagovat s topoizomerázami [37], tedy s enzymy ze skupiny izomeráz, které umí změnit terciární strukturu DNA. Mají schopnost rozštěpit vlákno DNA, popřípadě ho i znovu spojit. Dělí se na topoizomerázu I. a II. Bylo prokázáno, že u rychle se množících buněk, jako jsou například i nádorové buňky, je detekovatelné zvýšené množství těchto topoizomeráz [37]. Bylo zjištěno, že omezením jejich aktivity vhodnými inhibitory by mohlo být chemoterapeutickým přínosem. Slibnými inhibitory topoizomeráz z této čeledi jsou alkaloidy ungeremin, narciprimin a alolycoricidin [37].

Za nejvýznamnější mechanismus působení se považuje jejich protinádorová aktivita indukci apoptózy. Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je mechanismus sloužící k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk. Tento proces je spuštěn složitou kaskádou různých látek. Tyto látky mohou být jednak mimobuněčného původu, tak i produkovány uvnitř samotné buňky. Mimobuněčnými induktory mohou být toxiny, cytokiny, oxid dusnatý a mnoho dalších. Vnější cesta aktivace začíná buď průnikem samotných látek do nitra buňky, nebo na její cytoplazmatické membráně, konkrétně na určitých receptorech tzv.

receptory smrti. Na tyto receptory se vážou různé ligandy, příkladem je TNF („Tumor necrosis factor“) či Fas ligand. TNF jsou produkty NK buněk a Fas ligandy se nacházejí na povrchu cytotoxických T-lymfocytů. Mohou tak aktivovat apoptózu u vybraných buněk. Vnitřní cesta aktivace se uplatňuje, pokud je buňka v jakékoliv formě stresu. Může být přítomna poškozená DNA, jed v buňce či probíhat oxidativní stres. Tyto signály potom působí na mitochondrie, které jsou důležité v jednom z biochemických procesů, v buněčném dýchání. Z poškozených mitochondrií se posléze uvolní cytochrom c, který působí jako silný katalyzátor apoptózy. Konečnými účastníky apoptózy jsou intracelulární proteázy, známé jako kaspázy, které jsou aktivovány proteiny, jako jsou Fas ligand či cytochrom c. Indukce apoptózy u nádorových buněk je klíčovým předpokladem úspěšné terapie. Hlavní překážkou léčby je vrozená nebo získaná rezistence těchto buněk k faktorům indukujících jejich smrt. Mezi Amaryllidaceae alkaloidy, které jsou schopny indukovat apoptózu, můžeme zařadit lykorin, pankratistatin, narciklasin, krinamin, narciprimin, haemathamin, haemathidin a další [37].

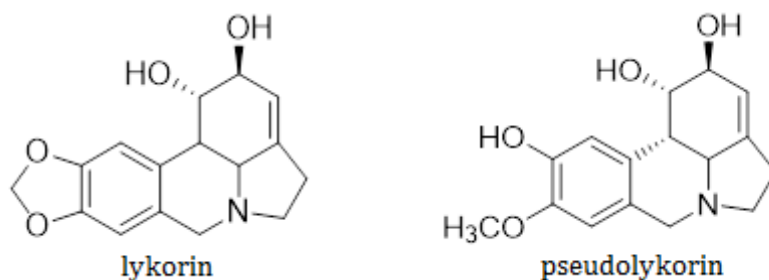
3.4.2 Lykorinový typ

Skupina lykorinových alkaloidů je rozsáhlá a stále se rozšiřující skupina Amaryllidaceae alkaloidů, která zahrnuje téměř 200 strukturních typů a ty mají rozmanité spektrum biologických aktivit [38]. Struktura tohoto typu je založena na základním fenanthridinovém jádře tvořeném kruhy A, B a C s různým stupněm oxygenace v každém z kruhů [38]. Další skutečností je přítomnost ethylového řetězce spojujícího atomy C-4 a dusíkatý atom, čímž vzniká 1,2,3-trisubstituovaný pyrrolový D-kruh (Obr. 4) [38].



Obrázek 4: Obecná struktura lykorinového typu.

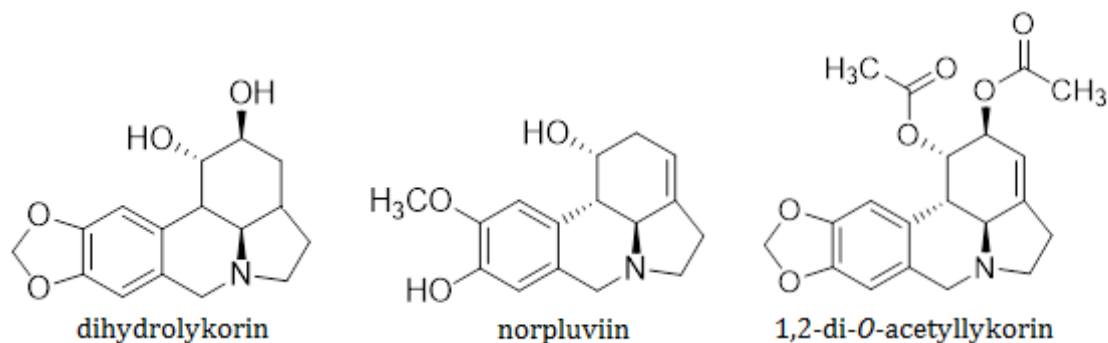
V roce 1877 byl izolován lykorin (Obr. 5) jakožto první alkaloid z čeledi Amaryllidaceae z *Narcissus pseudonarcissus*. O několik desítek let později, v roce 1956, byla objasněna i jeho struktura. Zajímavostí je, že jeho antiproliferativní účinky vůči několika vybraným buněčným nádorovým liniím byly známy od roku 1920 [37]. Mezi první práce patří záznamy z roku 1952, kdy se objevily inhibiční účinky lykorinu na klíčení a růst u bobu obecného (*Vicia faba* L.) v koncentraci 10^{-2} M a to v souvislosti s několika cytologickými změnami včetně inhibice metafáze v mitotickém dělení buněk a chromozomální aberace. Závěrem bylo zjištění, že fyziologické účinky lykorinu jsou zprostředkovány působením na buněčné dělení. Další studie těchto účinků ukázaly, že i při nižších koncentracích (10^{-4} – 10^{-6} M) lykorin inhibuje dělení buněk v dřevném parenchymu salátu a v tekutých kvasinkových kulturách [38].



Obrázek 5: Struktura lykorinu a pseudolykorinu

Alkaloidy lykorin a pseudolykorin (Obr. 5) jsou schopné zabránit tvorbě peptidické vazby v proteosyntéze katalyzované eukaryotními ribozomy. Nicméně se ukázalo, že tyto dva alkaloidy mají různá vazebná místa na peptidické transferáze na ribozomální 60S podjednotce, kterou sdílí s dalšími Amaryllidaceae alkaloidy haemathaminem, pretazettinem a narciklasinem [38]. První rozsáhlejší studie v této oblasti byla provedena v roce 1976, kdy bylo podrobena srovnávací analýze několik Amaryllidaceae alkaloidů na inhibici proteosyntézy u eukaryotních buněk. Minimální inhibiční koncentrace pozorovaná u lykorinu, pseudolykorinu a

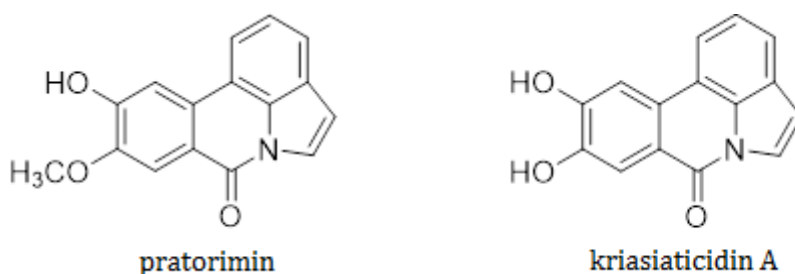
dihydrolykorinu (Obr. 6) vůči HeLa buňkám byla 6, 25 a 100 μM . Jediný norpluvin (Obr. 6) se ukázal jako neaktivní (Tab. 2) [38].



Obrázek 6: Struktura dihydrolykorinu, norpluviinu a 1,2-di-O-acetyllykorinu

V roce 1988 byli lykorin a 1,2-di-O-acetyllykorin (Obr. 6) testovány na cytotoxicitu vůči myším melanomu BL6 buňkám. Získané IC_{50} odpovídaly 1,8 a 8,9 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 2) [38].

V roce 2001 byla podrobena studiu asijská rostlina *Crinum asiaticum* var. *japonicum* pro její cytotoxické alkaloidní složky, což vedlo k izolaci několika lykorinových alkaloidů: lykorinu, pratoriminu a kriasiatricidinu A (Obr. 7). V *in vitro* pokusech byla sledována jejich cytotoxicita vůči vybraným nádorovým buňkám Meth-A (myší sarkom) a LLC (Lewisův plicní karcinom) [29]. Z těchto tří alkaloidů byl lykorin nejvíce cytotoxický, pratorimin vykazoval pouze mírnou aktivitu vůči Meth-A buňkám a kriasiatricidin byl mírně účinný na Meth-A a LLC buňky (Tab. 2) [9, 29]. Vzhledem k silným protinádorovým účinkům lykorinu byly tyto účinky zkoumány i *in vivo* na BDF-1 myších, kterým byly subkutánně implantovány LLC buňky. Výsledky ukázaly, že po 14-ti denní léčbě lykorinem v dávce 10mg/kg/den bylo pozorováno významné zmenšení nádoru [9].



Obrázek 7: Struktura pratoriminu a kriasiatricidinu A

V roce 2002 byla zveřejněna studie zabývající se studiem vlivu lykorinu na myší nádorové lymfatické buňky typu L5178 i na jejich multirezistentní formu L5178mdr. Z devíti popsaných alkaloidů izolovaných z cibulí *Sprekelia formosissima* a *Hymenocallis x festalis* vykázal lykorin největší cytotoxický účinek vůči oběma uvedeným typům nádorových buněk (IC_{50} 0,27 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$) (Tab. 2) [39].

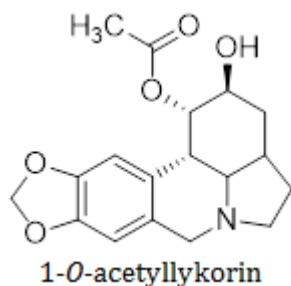
Liu a jeho spolupracovníci v roce 2004 studovali cytotoxické účinky lykorinu na akutní promyelocytární leukemické buňky HL-60. Hodnota IC_{50} byla 1 μM (Tab. 2) [40]. Později, v roce 2007, své studie rozšířili o *in vivo* výzkum. Byl použit myší model BALB/c s těžkou kombinovanou imunodeficiencí. Myši byly naočkovány buňkami HL-60 (5×10^6) a poté jim byl intravenózně aplikován lykorin 1× denně po dobu 18 dnů v dávkách 5 nebo 10 mg/kg/den. V periferních buňkách byl pozorován procentuální pokles nezralých zrnných leukocytů a monocytů. Střední doba přežití byla u obou lykorinem léčených skupin o 30 – 34 % delší než u kontrolní skupiny a to bez projevů nežádoucích účinků, jako je snížení tělesné hmotnosti. Lykorin rovněž zmírnil infiltraci nádorových buněk do jater a kostní dřeně u infikovaných zvířat [41].

Experimenty v roce 2007 sledovaly účinky lykorinu na buňky lidského mnohočetného myelomu KM3. Po 48 hodinách bylo dosaženo snížení počtu životaschopných buněk z 89 % na 21 % s hodnotou IC_{50} 1,25 μM (Tab. 2). Ve srovnání se standardním léčivem melfalanem, který se rutinně používá k léčbě mnohočetného myelomu v koncentracích 1 – 16 μM , dochází ke snížení počtu buněk z 84 % na 10 % při použití poloviční efektivní koncentrace 3,2 μM . To naznačuje, že tyto nádorové buňky byly až 2,5krát citlivější k lykorinu než k léčivům užívaných v klinické praxi [42].

V roce 2009 byl proveden výzkum zabývající se vlivem alkaloidů lykorinového strukturního typu na rakovinné buňky, které jsou buď citlivé nebo rezistentní k proapoptickým podnětům. Lykorin vykazoval střední aktivitu (IC_{50} 6,3 μM) u šesti rakovinných buněčných linií (A549, U373, OE21, SKMEL-28, Hs683 B16F10) bez důrazu na citlivost a rezistenci buněk. Po tomto zajímavém zjištění byly provedeny testy *in vivo* na myším melanomovém modelu B16F10. Tyto buňky byly ortotopicky umístěny do myšího mozku, což mělo napodobit mozkové metastázy u melanomu, které jsou běžné u mnoha pacientů a nevedou k příznivé prognóze. Bylo dokázáno, že lykorin aplikovaný intravenózně v dávkách 5, 10, 20,

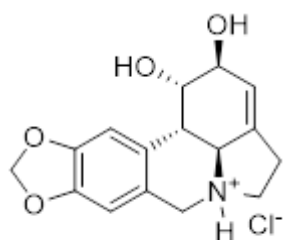
40 nebo 80 mg/kg nezpůsobil jakékoliv nežádoucí účinky na zdravé B6D2F1 myši během 28-denní léčby. Lykorin taktéž výrazně zvýšil přežití B16F10 myší nesoucí melanomy při intravenózním podání třikrát týdně v dávce 40 mg/kg po třítýdenní léčbě. Jeho účinná dávka 40 mg/kg byla tedy značně nižší než jeho maximální tolerovaná dávka (MTD > 80 mg/kg). Kromě toho bylo prokázáno, že lykorin je schopen přestupovat přes hematoencefalickou bariéru [43].

Ve stejném roce byla provedena studie na cytotoxické účinky derivátů lykorinu na lidské leukemické Jurkat buňky, z nichž lykorin a pseudolykorin byly nejaktivnější. V dávce 10 μ M při působení přes 72 hodin byly obě sloučeniny schopné indukovat apoptózu v Jurkat nádorových buňkách z 87 % a 86 % (Tab. 2). 1-*O*-Acetyllykorin (Obr. 8) byl taktéž schopný apoptického účinku, který byl více než 4% při koncentraci 10 μ M (Tab. 2) [38].



Obrázek 8: Struktura 1-*O*-acetyllykorinu

V roce 2013 byla provedena studie na cytotoxicitu lykorin-hydrochloridu (Obr. 9) zahrnující *in vitro* i *in vivo* modely lidských vaječnickových rakovinných buněk Hey1B. Nejprve bylo prokázáno, že lykorin-hydrochlorid v závislosti na dávce zastavuje proliferaci Hey1B buněk s IC₅₀ 1,2 μ M (Tab. 2). Poté v xenografickém nádorovém modelu byly BALB/c neosrstěným myším subkutánně injikovány Hey1B buňky (5×10^6 buněk/200 μ l). Následně jim byla každý den aplikována intraperitoneálně injekce lykorin-hydrochloridu v množství 15 mg/kg. Po 24 dnech se neprojevíly zjevné vedlejší účinky a nebyla ovlivněna ani celková tělesná hmotnost. Na druhou stranu byl zjištěn pokles hmotnosti nádoru, kdy u testovaných zvířat byl $103,2 \pm 51,5$ mg a $271 \pm 22,7$ mg u kontrolních myší, což naznačuje, že lykorin-hydrochlorid inhibuje růst nádoru *in vivo* [44].



lykordin hydrochlorid

Obrázek 9: Struktura lykordin hydrochloridu

Tabulka 2: Přehled sledovaných alkaloidů, buněčných linií, na kterých byly prováděny cytotoxické studie [29, 38-40, 42-44].

Alkaloidy lykordinové řady	Buněčné linie, cytotoxický index										
	HeLa	HL-60	Meth-A	LLC	L5178	L5178mdr	B16F10	BL6	KM3	Jurkat	Hey1B
Lykordin	6 ^a	1 ^a	0,3 ^b	0,5 ^b	0,27 ^c	0,25 ^c	6,3 ^a	1,8 ^c	1,25 ^a	87 ^d	
Pseudolykordin	25 ^a									86 ^d	
Dihydrolykordin	100 ^a										
Norpluviin	na										
Pratorimin			4,1 ^b	>10 ^b							
Kriasiaticidin			3,2 ^b	4,2 ^b							
1,2-di-O-Acetyllykordin								8,9 ^c			
1-O-Acetyllykordin										>40 ^d	
Lykordin-hydrochlorid											1,2 ^a

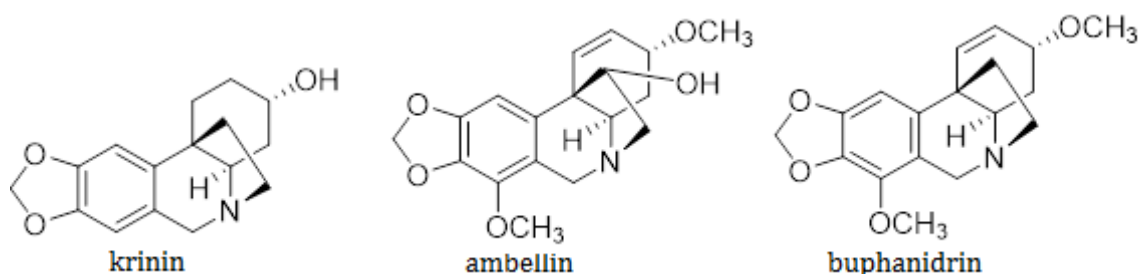
^a = IC₅₀ (μM); ^b = ED₅₀ (μg/ml); ^c = IC₅₀ (μg/ml), ^d = indukce apoptózy v %, na = neaktivní

3.4.3 Krininový typ

Do této skupiny se řadí haemathamin, haemanthidin, krinin, krinamin, maritidin, ambellin, buphanisin a další [7, 9]. Z hlediska struktury je u krininových alkaloidů typické přemostění ethylovým můstkem z dusíkatého atomu N na uhlík C-10b. Dochází tak ke vzniku dvou stereoizomerů α a β. Krinamin, haemathamin a haemanthidin patří mezi α stereoizomery, zatímco ambellin a buphanisin mezi β

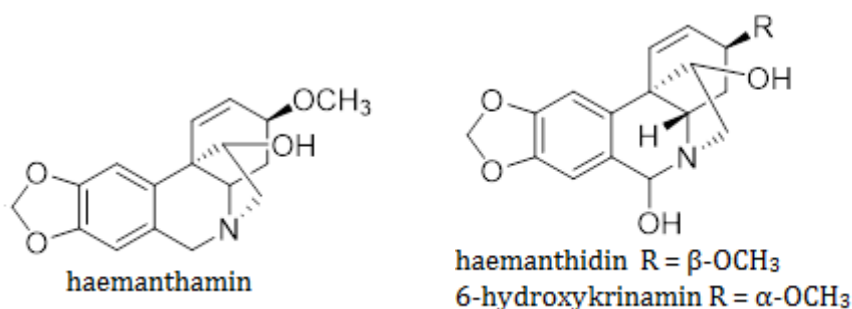
stereoizomery [9]. Tyto alkaloidy jsou odvozeny od 5,10*b*-ethanofenanthridinu [12]. Nejnovější statistiky ukazují, že přibližně 60 těchto alkaloidů bylo podrobena cytotoxickým studiím vůči stejnému počtu buněčných nádorových linií [9].

Ve srovnání se zástupci z lykorinové řady bylo v počátku provedeno méně *in vivo* studií ohledně jejich cytotoxických účinků. Ovšem už v roce 1958 byla *in vivo* zkoumána aktivita krininu, haemanthaminu, haemathidinu, ambellinu a buphanidrinu (Obr. 10 a 11) na CAF₁ myši s implantovanými rakovinnými buňkami S37. Žádný z nich však nebyl aktivní. Nicméně v roce 1980 bylo uvedeno, že haemathamin a 6-hydroxykrinamin (Obr. 11) způsobovaly po 42 a 46 dnech jejich expozice u BALB/c myši infikovaných Rauscher leukemií prodloužení jejich života o 31 – 36 % oproti kontrolní skupině [9].



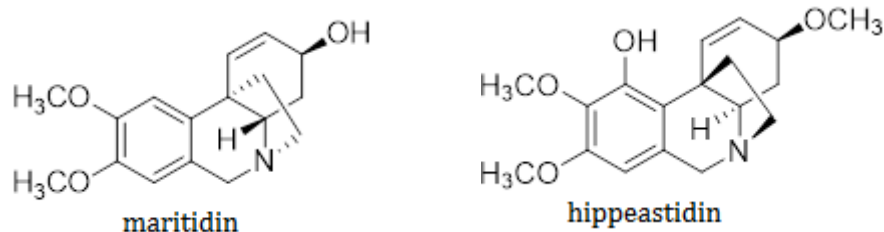
Obrázek 10: Struktura krininu, ambellinu a buphanidrinu

Haemanthamin může být v čeledi Amaryllidaceae nevratným způsobem enzymaticky přeměněn na haemanthidin [31]. Haemanthamin vykazuje významnou cytotoxickou aktivitu proti mnoha různým rakovinným buněčným liniím zahrnující MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF7, CEM, K562, G-361, SKMEL. [31] Rovněž byl identifikován jako vůbec nejaktivnější krininový alkaloid u lidských karcinomů (ED₅₀ 0,3 µg/ml) proti fibrosarkomům buněčné linie HT1080 [45].



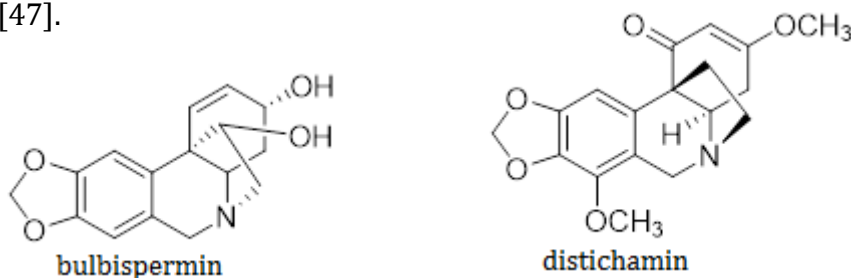
Obrázek 11: Struktura haemanthaminu, haemanthidinu a 6-hydroxykrinaminu

V roce 1986 byly sledovány cytotoxické účinky maritidinu a hippeastidinu (Obr. 12), dvou krininových alkaloidů izolovaných z *Hippeastrum anunuca* z Jižní Ameriky. Oba alkaloidy vykazovaly výraznou *in vivo* protinádorovou aktivitu vůči lidskému KB ústnímu epidermoidnímu karcinomu s ED₅₀ 0,51 a 0,27 µg/ml. Oba alkaloidy byly testovány na jejich klastogenní účinky v mikronukleárním testu, kterým se dá spolehlivě stanovit genotoxicita cytostatických látek. Tvorba vedlejšího jádra (mikrojádra) je charakteristický morfologický znak pozorovaný v buňkách vystaveným klastogenním látkám. Během testu byla odebírána kostní dřeň ze stehenní kosti BALB/c myši a následně byla zkoumána tvorba mikrojader 30 hodin po intraperitoneální aplikaci destilované vody, adriamycinu (10 µg/g tělesné hmotnosti myši) nebo příslušných alkaloidů (maritidin, hippeastidin) v různých koncentracích. Ve třech různých dávkách hippeastidinu (0,27; 0,54 a 1,08 µg/g) došlo k výraznému zvýšení četnosti mikrojader (mikrojádra/1000 buněk). Nejvyšší počet (10,6) byl k vidění u nejvyšší hodnoty testované dávky. Adriamycinem ošetřená zvířata vykazovala četnost 13,4; 2x větší než u neošetřených zvířat. Podobně maritidin 10,1 po jediném ošetření dávkou 0,51 µg/ml [9].



Obrázek 12: Struktura maritidinu, hippeastidinu

Bulbispermin (Obr. 13) patřící mezi α-krininové alkaloidy byl poprvé získán z Amaryllidaceae rostliny *Crinum bulbispermum* [46]. V roce 2012 bylo zveřejněno, že bulbispermin má silný cytotoxický účinek proti lidským leukemickým HL-60 buňkám [47].



Obrázek 13: Struktura bulbisperminu a distichaminu

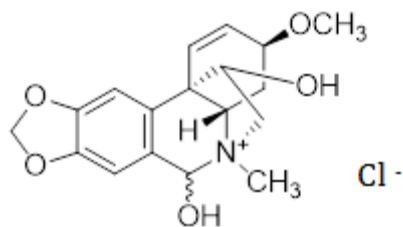
Ve stejném roce byl testován distichamin (Obr. 13) na protinádorovou aktivitu několika nádorových buněčných linií: akutní lymfoblastická leukemie (CEM), chronická myeloidní leukemie (K562), prsní adenokarcinom (MCF7), maligní melanom (G-361), karcinom děložního hrdla (HeLa) a normální lidské zdravé fibroblasty (BJ). Distichamin byl aktivní vůči všem buněčným nádorovým liniím, kdy se hodnoty IC_{50} pohybovaly mezi 2,2 – 14,7 μ M. Hamenathamin, jako další z testovaných alkaloidů, působil taktéž na všechny uvedené buněčné linie s IC_{50} v rozmezí 2,1 – 8,1 μ M (Tab. 3) [48].

Tabulka 3: Cytotoxická aktivita vybraných alkaloidů proti různým nádorovým buněčným liniím a jedné zdravé buněčné linii [48].

<i>Alkaloid</i>	<i>Buněčné linie IC_{50} (μM)</i>					
	<i>nádorové</i>					<i>zdravé</i>
	CEM	K562	MCF7	HeLa	G-361	BJ
Haemanthamin	2,1 \pm 0,4	3,4 \pm 1,6	8,1 \pm 3,3	7,0 \pm 2,2	3,7 \pm 0,4	2,7 \pm 0,2
Distichamin	4,5 \pm 1,6	4,1 \pm 0,9	2,3 \pm 0,8	2,2 \pm 0,1	14,7 \pm 0,1	10,5 \pm 1,9

V roce 2013 proběhla studie, kde hlavním cílem bylo zkoumat účinky haemanthaminu a haemanthidinu na indukci apoptózy u lidských leukemických buněk Jurkat [49]. Po jejich vystavení těmto dvěma alkaloidům (v koncentracích od 5 do 20 μ M) byla pozorována zvýšená apoptóza, která byla doprovázena aktivací kaspáz 3, 7, 8 a 9 a naopak snížen mitochondriální membránový potenciál a zastaven buněčný cyklus v G1 a G2/M fázi [31]. Ve výsledku bylo prokázáno, že haemanthidin je účinnější proti leukemickým T-lymfocytům nežli haemanthamin. Bylo také zjištěno, že apoptický účinek haemanthaminu a haemanthidinu u leukemických buněk je výraznější než-li u gama záření [49].

V roce 2014 byla zkoumána cytotoxicita *N*-methylhaemathidin-chloridu (NMHC) (Obr. 14) na tři rakovinné buňky slinivky (AsPC-1, BxPC-1 a Mia PaCa-2). Výzkum *in vitro* ukázal, že při použití NMHC o koncentraci 0,5 - 1 μ M došlo k významnému zpomalení růstu všech tří buněčných linií, což vedlo ke snížení glykolýzy, zpomalení buněčného cyklu a následně k apoptické smrti. Kromě toho bylo dokázáno, že NMHC je účinnější ve všech třech případech než gemcitabin nebo 5-fluorouracil, zatímco na zdravé buňky tlustého střeva (NCM450) působí průměrně. Vzápětí byla aktivita NMHC zkoumána i *in vivo* na myším modelu. Pěti-týdenním neosrstěným BALB/c myším byly implantovány lidské rakovinné pankreatické buňky AsPC-1 ($1,5 \times 10^6$). Nádory se nechaly vyrůst do velikosti ~ 150 mm³. Poté bylo myším intravenózně aplikován jednou denně NMHC (25 mg/kg) nebo fyziologický roztok. Po deseti dnech aplikace se ukázalo, že růst nádoru je viditelně inhibován u myší léčených pomocí MNHC oproti myším, kterým byl aplikován pouze fyziologický roztok. Rovněž byla snížena i velikost a hmotnost nádoru. Zároveň NMHC nevykazoval žádný negativní dopad na hmotnost testovaných zvířat a neměl kardiotoxické, hepatotoxické ani nefrotoxické účinky [50].



***N*-methylhaemanthidin chlorid**

Obrázek 14: Struktura *N*-methylhaemanthidin chloridu

Zajímavá studie byla zveřejněna v roce 2015, kdy byly stanoveny *in vitro* hodnoty IC₅₀ u haemathaminu, haemathidinu, lykorinu a dalších 10 alkaloidů proti dvěma lidským gastrointestinálním p53-zmutovaným nádorovým buněčným liniím Caco-2 a HT-29 [3]. Protein p-53 slouží jako tumor supresorový gen. Reguluje expresi mnoha genů, které mohou kontrolovat růst buněk, apoptózu, opravu DNA, stárnutí buněčných populací a angiogenezi. Protein p53 vyhledává na DNA poškozená místa a při jeho nalezení spouští transkripci specifického genu, který zastaví buněčné dělení, dokud nedojde k reparaci poškozeného místa. Jestliže místo nelze opravit, je zahájena apoptóza. Význam spočívá v tom, že u mnoha lidských

nádorů je gen pro tento protein zmutovaný a nemůže plnit svou klíčovou funkci. Takovým příkladem je i kolorektální karcinom. Toto onemocnění s vysokou úmrtností je třetí nejvíce diagnostikované nádorové onemocnění po celém světě. Použité alkaloidy byly izolovány z rostlin *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans*. Mezi testovanými alkaloidy byly právě haemanthamin, haemanthidin a lykorin nejúčinnější. Všechny 3 sloučeniny vykazovaly silný cytotoxický potenciál proti oběma testovaným buněčným liniím. Zdravé lidské epitelové buňky střeva FHs 74 Int byly použity jako kontrola pro stanovení celkové toxicity. Důležitým zjištěním bylo, že haemathamin a lykorin mají 20× nižší toxicitu vůči těmto zdravým intestinálním buňkám. Vinorelbin, semisyntetický vinka alkaloid, byl použit jako pozitivní kontrola [3] (Tab. 4).

Tabulka 4: Cytotoxicita testovaných sloučenin proti dvěma nádorovým buněčným liniím a jedné nenádorové intestinální buněčné linii [3].

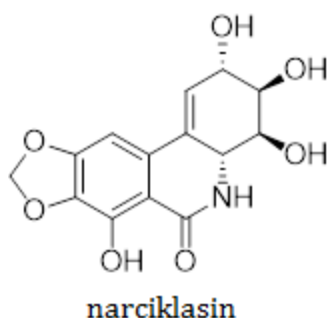
Sloučenina	Nádorové buňky		Zdravé buňky
	Caco-2 IC ₅₀ (μM)	HT-29 IC ₅₀ (μM)	FHs 74 Int IC ₅₀ (μM)
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Haemathidin	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,1	11,6 ± 0,9
Lykorin	0,99 ± 0,08	1,2 ± 0,0	22,7 ± 0,1
Vinorelbin ^R	0,03 ± 0,00	netestován	4,0 ± 0,3

^R = standard

3.4.4 Narciklasinový typ

Alkaloidy v této skupině jsou deriváty odvozené od molekuly fenanthridinu [7]. Z pohledu cytotoxické aktivity jsou nejvíce diskutované látky narciklasin, pankratistatin a lykoricidin [11]. V literatuře se často setkáváme s jejich označením jako isokarbostyrily. Jejich cytotoxicita byla hodnocena u cca 60 nádorových buněčných linií a průměrná hodnota IC₅₀ byla 0,046 μM pro narciklasin, 0,33 μM pro lykoricidin (10x slabší) a 0,26 μM pro pankratistatin (5x slabší) [12].

Narciklasin (Obr. 15), také známý jako lykoricidinol, byl poprvé izolován v roce 1967 z cibulí narcisů v rámci výzkumného programu hledání protirůstových faktorů [6]. Zajímavostí je, že lykoricidinol byl poprvé izolován v roce 1968 jako regulátor růstu rostlin z cibulí *Lycoris* a až tehdy se ukázalo, že je totožný s narciklasinem [6]. Narciklasin byl tedy objeven nezávisle na sobě různými skupinami v téměř stejnou dobu.



Obrázek 15: Struktura narciklasinu

Brzy po izolaci narciklasinu bylo prokázáno, že vykazuje různé inhibiční účinky na růst rostlin, včetně klíčení semen, růst sazenic, růst a vývoj plastidů a chloroplastů. Asi o 10 let později byly první důkazy o jeho protinádorové aktivitě, kdy způsoboval inhibici syntézy eukaryotické ribosomální bílkoviny v králičích retikulocytech. Přesněji řečeno k inhibici proteosyntézy došlo v důsledku vzájemné interakce s 60S ribosomální podjednotkou [31]. Tyto výsledky byly potvrzeny a rozšířeny následnými detailními studiemi. Bylo zjištěno, že IC_{50} narciklasinu pro inhibici proteosyntézy je 70 nM. Syntéza RNA nebyla ovlivněna, zatímco DNA syntéza byla mírně snížena a to pouze při vysokých koncentracích. Vazebné místo narciklasinu bylo umístěno na 60S ribosomální podjednotce a bylo zjištěno, že se překrývá se známými inhibitory peptidyl-transferázy anisomycinem a trichoderminem [6].

Na počátku roku 1990 byla zjištěna široká cytotoxická aktivita narciklasinu, kdy byl testován na 60 lidských nádorových buněčných liniích. Průměrná hodnota IC_{50} narciklasinu byla 15,5 nM. Zajímavostí je, že melanomové buněčné linie byly vůbec nejcitlivější nádorové buňky [6].

Při použití vysoké koncentrace narciklasinu 1 μ M bylo prokázáno, že apoptická smrt nádorových buněk je způsobena prostřednictvím Fas/DR4 smrtícího komplexu a následného působení kaspázy 8. Nicméně zda budou následné efektorové kaspázy aktivovány přímo nebo prostřednictvím mitochondrií, závisí na

typu buňky. V rakovinných buňkách prostaty PC-3 narciklasin přímo aktivuje efektorové kaspázy přes Fas/DR4 spouštěcí mechanismus, který aktivuje kaspázu 8. V nádorových buňkách prsu MCF-7 musí dojít k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a poté dochází ke vzniku apoptozomů [51].

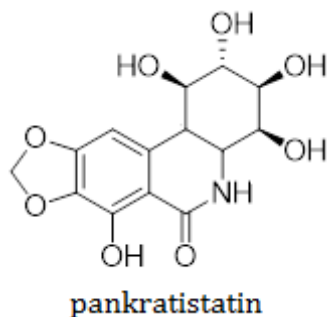
V roce 2010 byly zkoumány účinky narciklasinu na několika melanomových buněčných liniích, které zahrnovaly buňky VM-21, VM-47 a VM-48, lidský kožní melanom SKMEL-28 a buňky myšího melanomu B16F10. Studie byla významná, neboť melanomy jsou známy pro svou odolnost vůči proapoptickým podnětům. U narciklasinu byly *in vitro* prokázány jeho silné růstové inhibiční účinky a to bez ohledu na úroveň této odolnosti. Hodnoty IC_{50} se pohybovaly v rozmezí od 0,05 μM u buněk VM-47 do 0,005 μM u buněk B16F10 [52]. Zájmem vědců bylo přijít na to, jakým mechanismem narciklasin působí. Zjistili, že jeho cílem je eukaryotní translační prodlužovací faktor eEF1A. Jedná se o velmi zajímavý protein, který na jedné straně dodává aminoacyl-tRNA ribozomům a na druhé straně se podílí na organizaci aktinového cytoskeletu. Podílí se tedy na regulaci morfologie, cytokinezi a migraci buněk [6]. Následně byly provedeny *in vivo* studie a melanomové metastazující buňky (VM-48) pocházející z lidského mozku byly implantovány do mozku šest týdnů starých neosrstěných myší. Výsledky ukázaly, že aplikací narciklasinu v množství 1 mg/kg dvakrát týdně po dobu tří týdnů lze dosáhnout významného léčebného přínosu u tohoto agresivního typu melanomu. Pro srovnání temozolomid, již zavedené chemoterapeutikum, bylo třeba podávat v množství 40 mg/kg třikrát týdně po dobu 3 týdnů [52].

Narciklasin je induktor buněčné smrti v nádorových buněčných liniích, ale na normální zdravé buňky působí méně cytotoxicky. Průměrná hodnota IC_{50} po 72 hodinách léčby, která byla vypočítána pro 6 lidských buněčných nádorových linií (A549, MCF-7, PC-3, LoVo, U373 a BxPC3), byla 30 nM. Odpovídající průměrná hodnota IC_{50} pro tři fibroblastické buněčné linie (WI-38, CCD25Lu a WS1) byla 7,5 μM [51].

V nedávné době byly popsány silné cytotoxické účinky narciklasinu na buněčné linie HL-60 a HSC-2 s hodnotou IC_{50} 0,018 a 0,05 μM . Proapoptická aktivita byla charakterizována morfologickými změnami zahrnující kondenzaci chromatinu, smrštění buňky a aktivaci kaspázy 3. Aktivace byla u lidských premyelocytárních

leukemických buněk HL-60 mnohem výraznější po působení narciklasu než cisplatiny, jež byla použita jako pozitivní kontrola [31].

Pankratistatin (Obr. 16), blízký strukturní analog narciklasu, byl izolován z rostliny *Hymenocallis littoralis* v roce 1984 [31]. Brzy bylo dokázáno, že má antineoplastické a cytostatické účinky [31].



Obrázek 16: Struktura pankratistatinu

V roce 2004 byla prokázána schopnost pankratistatinu indukovat apoptózu v lidských leukemických Jurkat buňkách při použití jeho koncentrace 1 μM a to bez toxických účinků na zdravé jaderné krevní buňky (lymfocyty). Dále bylo zjištěno, že indukce apoptózy pankratistatinem je spojena s aktivací kaspázy 3, převrácením vnitřního listu membrány, který je bohatý na fosfatidylserin, na vnější list membrány, dále produkcí reaktivních forem kyslíku a ztrátou potenciálu na mitochondriální membráně [31, 53]. Těchto poznatků bylo využito později.

V roce 2010 byly zkoumány účinky pankratistatinu *ex vivo* proti různým leukemickým buňkám. Pro tyto případy byly získány periferní krevní vzorky od pacientů s leukemií, ve kterých bylo identifikováno 11 různých buněčných leukemických linií (AML-M3, AML-M2, AMoL-M5a, CML, AML-M5a, ALL-L3, CMML-M4, Mantel cell lymphoma, AML, AML-M0, AML-MDS) [9, 54]. Periferní krev byla rovněž odebrána i zdravým jedincům, nekuřákům, v rozmezí věku 25 – 50 let. Krevní buňky byly ošetřeny nejpozději do 3 hodin od odběru po dobu až 48h 1 μM roztokem pankratistatinu. Apoptické účinky byly zjištěny u všech leukemických buněk a to v rozmezí od 17,7 % do 70,8 % (Tab. 5). Za těchto podmínek bylo také prokázáno, že pankratistatin je účinnější nežli paklitaxel, který byl podáván v nižší dávce 0,5 μM . Krev zdravých dobrovolníků nebyla ovlivněna, což poukazuje na hlavní charakteristiku pankratistatinu, a to že působí jako selektivní apoptické činidlo [54].

Tabulka 5: Souhrn údajů o léčených pacientech a výsledky po léčbě pankratistatinem [54].

Pacient	Věk pacienta	Diagnóza	Apoptóza %
1	60	AML-M3	64,9 ± 4,2
2	81	AML-M2	33,5 ± 7,7
3	53	AMoL-M5a	46,5 ± 7,9
4	73	CML	63,9 ± 2,2
5	23	AML-M5a	30,6 ± 1,6
6	66	ALL-L3	61,8 ± 9,8
7	62	CMML-M4	17,7 ± 2,7
8	74	AML-M2	48,6 ± 6,7
9	45	AML	63,9 ± 4,2
10	57	AML-M3	70,8 ± 5,9
11	68	AML-M2	46,8 ± 12,2
12	80	Lymfom z plášťových buněk	35,2 ± 6,6
13	47	AML	37,3 ± 7,7
14	71	AML-M0, recidivující	45,3 ± 11,3
15	65	AML-MDS, recidivující	37,3 ± 8,5

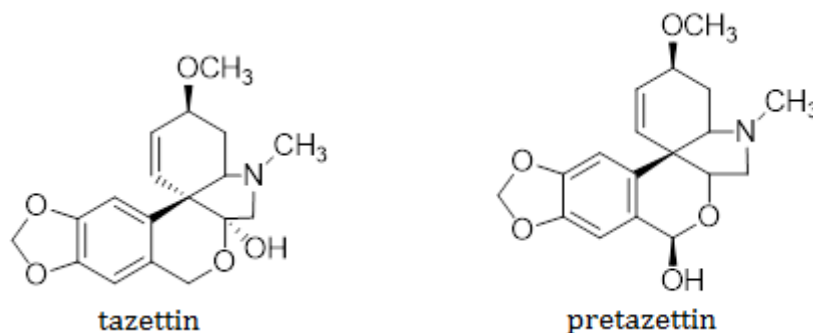
O rok později byly studovány účinky pankratistatinu na modelech s metastazujícím karcinomem prostaty. Využity byly dvě buněčné nádorové linie DU145 a LNCaP [55]. Ve studii se ukázalo, že pankratistatin v závislosti na dávce a čase významně snížil životaschopnost buněk citlivých na androgen (DU145), ale i buněk nereagujících na androgen (LNCaP) s EC_{50} 0,1 μ M [55]. Následně bylo prokázáno, že u obou typů buněk se na buněčné toxicitě podílely výrazné apoptické účinky pankratistatinu zvýšením produkce reaktivních kyslíkových radikálů a zhroucení mitochondriálního membránového potenciálu. Na druhou stranu normální lidské fibroblasty (NHF) zůstaly převážně neovlivněny. Na základě těchto výsledků byl vytvořen lidský xenoimplantát za použití buněčné linie DU145, který byl podkožně implantován do 6 týdnů starých samčích CD-1 homozygotních nahých myší [55]. Nádory byly ponechány růstu po dobu 4 týdnů, následně byla zvířata intratumorálně ošetřena vehikulem (5 μ l DMSO) nebo pankratistatinem (3 mg/kg). Dávka byla aplikována čtyřikrát týdně po dobu třech týdnů. Ukázalo se, že průměrný

objem nádoru byl přibližně o 50 % nižší u myší léčených pankratistatin než u těch, kterým bylo aplikováno pouze vehikulum [55]. K tomu průměrná tělesná hmotnost zvířat se mezi oběma skupinami významně neodlišovala. Rovněž se neobjevily ani zjevné toxické účinky pankratistatinu, ani reakce po jeho aplikaci (zarudnutí či otok), nebo změna chování/aktivity zvířat v porovnání s kontrolní skupinou [55].

V tomtéž roce byl rovněž sledován účinek *in vitro* a *in vivo* pankratistatinu v buněčných modelech lidského kolorektálního karcinomu. Po 72 h působení v závislosti na dávce pankratistatin způsobil pokles mitochondriálního membránového potenciálu a indukci apoptózy v liniích p-53 zmutovaných (HT-29) a v divokém typu p-53 (HCT116), dvou kolorektálních nádorových buněčných liniích s IC_{50} 0,1 μ M [9]. Tato dávka však nepůsobila na normální střevní fibroblasty (CCD-18Co), ty byly ovlivněny až při hodnotě IC_{50} 10 μ M [9]. Po tomto zjištění bylo přistoupeno na ověření účinků v *in vivo* modelech. Byl pozorován vliv podávání pankratistatinu na růst HT-29 xenoinplantátu v nahých myších [56]. Pankratistatin byl podáván intratumorálně dvakrát týdně v dávce 3 mg/kg. Po pěti týdnech léčby byl průměrný objem nádoru u pankratistatinem-léčených myší ($18,0 \pm 0,6$ mm³) přibližně 15-ti násobně nižší než průměrný objem nádoru u kontrolních myší ($249,5 \pm 170,2$ mm³) [56]. Tyto výsledky ukázaly, že pankratistatin výrazně snižuje růst HT-29 xenoinplantátů u nahých myší, aniž by byly pozorovány vedlejší účinky [56].

3.4.5 Tazettinový typ

Tato skupina zahrnuje deriváty odvozené od chemické struktury 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu. Tazettin (Obr. 17) vykazuje mírnou cytotoxickou aktivitu proti primárním buňkám fibroblastické linie LMTK a také velmi slabou aktivitu vůči leukemickým buňkám Rauscher [7].



Obrázek 17: Struktura tazettinu a pretazettinu

Na druhou stranu pretazettin (Obr. 17), jako biosyntetický prekurzor tazettinu, získal velkou pozornost nejen pro své protinádorové účinky. Studie prokázaly, že pretazettin s IC_{50} v rozmezí od 4,12 do 8,85 μM vykazuje cytotoxicitu proti buňkám fibroblastické linie LMTK, inhibuje buněčný růst HeLa buněk a je terapeuticky účinný proti pokročilé Rauscher leukemii, Ehrlichově karcinomu spojeného s ascitem, spontánní AKR lymfocytární leukemii a Lewisově karcinomu plic. Je to také jeden z nejaktivnějších Amaryllidaceae alkaloidů proti buňkám akutní lymfoblastické leukémie MOLT-4 [31]. Pretazettin dále inhibuje aktivitu P-glykoproteinu, produktu MDR1 genu. Dále zvyšuje aktivitu doxorubicinu u rezistentních forem myších leukemií [7]. Objev inhibice P-glykoproteinu je důležitý při vývoji protinádorové terapie, protože P-glykoprotein je energeticky závislý efluxní transportér poháněný hydrolýzou ATP a je nadměrně exprimován v různých rakovinných buňkách, kde je zodpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci způsobenou právě transportem podaného léčiva ven z buňky [31].

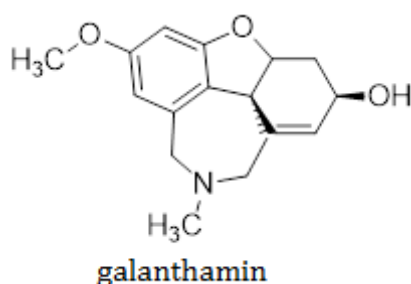
3.5 Amaryllidaceae alkaloidy využitelné v terapii Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní a neurodegenerativní porucha. Je to nejčastější forma demence u starších lidí, která je obvykle diagnostikována u osob ve věku nad 65 let. Vzhledem ke stárnutí lidské populace a nárůstu průměrné délky života se předpokládá, že se bude zvyšovat množství lidí s AD. Každým rokem přibývá asi 4,6 milionu nových případů po celém světě [57].

AD je mnohostranná porucha charakterizovaná akumulací extracelulárních β -amyloidních plaků, postupným výskytem intracelulární tau patologie, mitochondriálními abnormalitami a neurozánětlivými procesy, které pomalu ničí neurony a tím schopnost zapamatovat si a ukládat nové informace [58]. Dále se vyznačuje poruchami cholinergního systému. Lidský centrální nervový systém obsahuje dva typy cholinesteráz: acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BuChE) [26]. Hlavní role AChE je ukončení přenosu nervových impulzů na cholinergních synapsích rychlou hydrolýzou acetylcholinu (ACh). Nicméně na tomto procesu se podílí i enzym BuChE, která je schopna hydrolyzovat ACh, jakož i jiné estery. V mozku pacienta trpícím AD aktivita AChE klesá oproti zdravému, zatímco koncentrace BuChE se zvyšuje. Z tohoto důvodu je nutné zaměřit výzkum na hledání nových inhibitorů se schopností inhibice AChE i

BuChE. V současné době je inhibice acetylcholinesterázy nejpoužívanější terapeutická léčba příznaků AD [59].

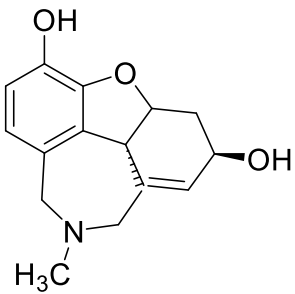
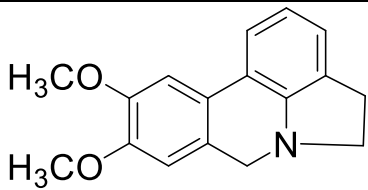
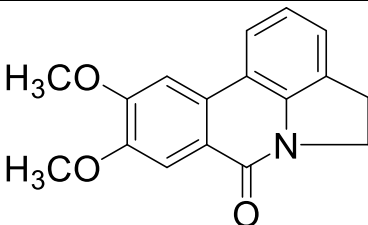
Cholinesterázové inhibitory jako donepezil, rivastigmin a galanthamin jsou v současné době hlavní používané látky u symptomatické léčby AD. Galanthamin (Obr. 18), důležitý alkaloidní zástupce nalezený v čeledi Amaryllidaceae, je využíván v léčbě na mírnou až středně těžkou AD díky jeho dlouhému působení, selektivitě, reverzibilitě a kompetitivní inhibici AChE aktivity [26]. Hodnota IC_{50} galanthaminu vůči HuAChE je $2,5 \pm 0,1 \mu M$ [59] a velmi často je využíván jako referenční látka. Na druhou stranu jeho inhibiční aktivita vůči HuBuChE je mnohem slabší, IC_{50} odpovídá $53,3 \pm 1,9 \mu M$ [59]



Obrázek 18: Struktura galanthaminu

U dalších Amaryllidaceae alkaloidů jako jsou sanguinin, assoanin a oxoassoanin byla rovněž popsána inhibiční aktivita vůči AChE [60]. Přehled těchto alkaloidů je uveden v tabulce (Tab. 6).

Tabulka 6: Přehled vybraných Amaryllidaceae alkaloidů a jejich inhibiční aktivity vůči AChE [60].

Alkaloid	Struktura	Rostlinný původ	IC ₅₀ μM
sanguinin		<i>Eucharis grandiflora</i>	0,10 ± 0,01
assoanin		<i>Narcissus assoanus</i>	3,87 ± 0,24
oxoassoanin		<i>Narcissus assoanus</i>	47,21 ± 1,13

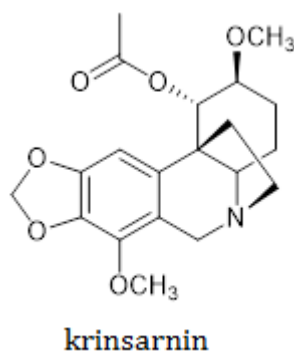
3.6. Amaryllidaceae alkaloidy a jejich další biologická aktivita

Amaryllidaceae alkaloidy lykorin (Obr. 5), hippeastrin a haemanthamin (Obr. 11) disponují střední až vysokou aktivitou proti chřipce. Zejména lykorin má silné *in vitro* účinky proti chřipce typu A N5H1. Tato látka byla studována i pro své účinky na poliovirus [12].

U narciklasinu (Obr. 15) byl studován profylaktický účinek na krysím modelu artritidy, kde výrazně potlačoval stupeň otoku ošetřených i neošetřených nohou. Tento alkaloid rovněž vykazuje antibakteriální aktivitu vůči *Corynebacterium fascians*, *Cryptococcus neoformans* a antivirovou aktivitu proti některým RNA flavivirům a bunyavirům [31].

Na podzim roku 2016 byl izolován nový alkaloid krininového typu, krinsarnin (Obr. 19), ze sušených cibulí jihoafrické rostliny *Nerine sarniensis*. Během studií bylo zjištěno, že má adulticidní účinky a že působí na přírodní bázi jako insekticid vůči *Aedes aegypti*. Tento komár je hlavní vektor horečky dengue, žluté zimnice a viru Zika. V této souvislosti je nejaktuálnější nedávná epidemie viru Zika,

protože by se mohla snadno stát potenciální hrozbou pro mezinárodní bezpečnost v oblasti veřejného zdraví. Virus způsobuje mikrocefalie a další vážné mozkové anomálie v průběhu těhotenství. Kontrola proti komárům je jednou z hlavních metod používaných pro snížení šíření viru. Výsledky popsané ve studii ukazují, že přírodní produkty, zejména Amaryllidaceae alkaloidy, jsou cenné zdroje, které musí být dále zkoumány jako přírodní insekticidy proti *Aedes Aegypti* [61].



Obrázek 19: Struktura krinsarninu

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Na počátku byla veškerá rozpouštědla přečištěna destilací. Vodným azeotropem byl zachycen destilační předek (cca 5 %) a teprve poté bylo predestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Všechna rozpouštědla byla uchovávána v hnědých lahvích.

Pro odpařování rozpouštědel z rostlinných extraktů byla použita vakuová odparka LABOROTA 4001 – efficient, Heidolph, Germany, jejíž součástí byla vodní lázeň při 40 °C a sníženém tlaku.

4.1.2 Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl zhotoven nalitím suspenze adsorbentu v mobilní fázi do chromatografické kolony. V samotném separačním procesu byla využita stupňovitá eluce na Al₂O₃ neutrálním.

4.1.3 Příprava desek pro preparativní TLC

Skleněné desky určené k preparativní TLC byly umyty a očištěny chloroformem. V rovnoměrné vrstvě na ně byla nanесena suspenze silikagelu ve vodě a poté probíhalo sušení alespoň 24 hodin.

4.1.4 Preparativní TLC

Desky s naneseným extraktem byly vyvíjeny v komorách, které byly syceny mobilní fází po dobu 30 – 40 minut.

4.1.5 Detekce biologicky aktivních látek na chromatografických deskách

Přítomné alkaloidy na TLC deskách byly detekovány pod UV lampou při vlnových délkách 254 nm a kontrolně i Dragendorffovým činidlem, kdy za přítomnosti alkaloidu vznikla oranžová skvrna.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla

Benzin, p.a. (Penta)
Chloroform p.a. (Penta)
Diethylamin, p.a. (Penta)
Diethylether p.a. (Penta)
Dichlormethan p.a. (Balex)
Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a. (Penta)
Ethylacetát p.a. (Penta)
Methanol, p.a. (Penta)
Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)
Toluen p.a. (Penta)

4.2.2 Chemikálie

Kyselina chlorovodíková (Penta)
Síran sodný, bezvodý (Penta)
Uhličitan sodný (Penta)
Silpearl (velmi čistý silikagel, sušený 2 h při 80 °C)
Dragendorffovo činidlo

4.2.3 Použité mobilní fáze

EtOAc:MeOH:DEA (5:4:1)
To:EtOAc:DEA (15:75:10)
cHx:DEA (9:1)
To:DEA (9:1)
To:Aceton:EtOH:NH₃ (40:40:6:2)

4.2.4 Chromatografické adsorbenty

Sloupcová chromatografie: oxid hlinitý (Al₂O₃), desaktivovaný 6 % vody.
Preparativní chromatografie: lité skleněné desky 15 × 15 cm, Kiesegel 60 GF₂₅₄.
Komerční desky: TLC Silica gel 60 F 254 Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

4.3 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu z rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN

4.3.1 Biologický materiál

Na tuto experimentální práci byly použity čerstvé cibule *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, které byly dodány firmou Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace vzorků byla provedena Prof. RNDr. Lubomírem Opletalem CSc. na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Rovněž je zde v herbáři uložen vzorek cibulí pod označením CUFPH-16130/AL-447.

4.3.2 Příprava ethanolického a alkaloidního extraktu

Čerstvé cibule (34 kg) kultivaru *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN byly postupně zpracovány po cca 1,2 kg. Cibule byly rozkrájeny, rozemlety, rozmixovány a nakonec opakovaně (2 – 3×) povařeny v ethanolu (EtOH 96%, v/v) pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po každém vaření byl obsah zfiltrován přes filtrační papír od hrubých nečistot a filtrát shromažďován. Ethanolický extrakt byl následně odpařen na vakuové odparce. Z odparku byl zbylý EtOH odpařen pomocí horké vody v azeotropní směsi a vzniklý odparek byl rozpuštěn v cca 1,5 l 5% HCl. Poté byl kyselý roztok 2x zfiltrován přes vliselín a zředěn destilovanou vodou na 4,5 l na pH 1. Následovalo vytřepávání, které probíhalo ve dvou fázích.

Během první fáze vytřepávání byla kyselá vodná fáze vytřepána diethyletherem (Et₂O) (2 × 4 l), aby došlo k odtučnění, dále alkalizována 10% uhličitánem sodným (Na₂CO₃) na pH 9-10 a vytřepána chloroformem (CHCl₃) (4 × 4 l), aby došlo k přechodu alkaloidních složek do organické fáze. Bylo získáno 40,49 g alkaloidního extraktu, k němuž byl přidán již dříve připravený extrakt. Tento extrakt byl připraven stejným postupem, jako je zde popsáno. Celkem bylo připraveno 51,44 g sumárního alkaloidního extraktu.

Pro druhou fázi vytřepávání bylo nutné nejprve sumární alkaloidní extrakt rozpustit v 1,5 l 5% HCl a přefiltrovat přes křemelinu. Vzniklo tak 1,5 l vodné fáze pro vytřepávání. Nejdříve bylo provedeno opětovné odtučnění vytřepáním s EtOH (4 × 250 ml), dále pak alkalizace kyselého roztoku pomocí 10% Na₂CO₃ (460 ml) a nakonec vytřepání Et₂O (10 × 250 ml). Přítomnost alkaloidní složky ve vodné fázi byla ověřena pozitivní reakcí s Mayerovým činidlem, proto bylo nutné pokračovat

ve vytřepávání CHCl_3 (16×250 ml). Organická fáze byla pokaždé jímána do baňky s bezvodým síranem sodným (Na_2SO_4), aby došlo k jejímu vysušení, a nakonec přefiltrována přes filtrační papír z důvodu odstranění Na_2SO_4 . Chloroformové a diethyletherové výtřepky byly spojeny a na konci bylo získáno 31,73 g alkaloidního extraktu.

4.4 Sloupcová chromatografie alkaloidního extraktu

4.4.1 Kolona

Adsorbent: 2100 g Al_2O_3 , sušený 12 h při 200 °C, deaktivovaný 6 % vody

Frakce: 500 ml

Mrtvý objem: 1570 ml

Průměr kolony: 5,8 cm

100 mg extraktu bylo odebráno pro kontrolu a ze zbylého množství byl připraven roztěr s Al_2O_3 v poměru 1:4 následujícím způsobem. Alkaloidní extrakt byl rozpuštěn v potřebném množství složek dichlormethanu (CH_2Cl_2) a CHCl_3 , smíchán s adsorbentem a poté bylo na vodní lázni odpařeno rozpouštědlo.

Stacionární fáze byla suspendována ve směsi rozpouštědel CHCl_3 :benzín (30:70) a nanесena na kolonu.

Mobilní fáze byla vybrána podle retenčního faktoru (0,175), kdy jako nejvhodnější byla vyhodnocena směs CHCl_3 :benzín (40:60), ale nakonec byla jako začáteční zvolena méně polární mobilní fáze (30:70). Během eluce bylo použito 6 různých směsí (CHCl_3 :benzín:EtOH) se zvyšující se polaritou (Tab. 7).

Na kolonu byla kontinuálně vlévána mobilní fáze ze zásobní baňky a eluát byl jímán o objemu 250 ml konstantní rychlostí. U každé frakce byla prováděna kontrolní detekce alkaloidů Dragendorffovým činidlem. V případě pozitivní reakce byla zhotovena TLC v různých chromatografických soustavách. Celkem bylo odebráno 493 frakcí (Tab. 8).

Tabulka 7: Frakce sloupcové chromatografie a jejich vyvíjecí soustavy pro souhrnné TLC.

Číslo frakce	Vyvíjecí soustava
1 – 137	Alkaloidy nebyly detekovány
137 – 204	To:EtOAc:DEA (7:2:1)
205 – 272	To:EtOAc:DEA (45:45:10)
273 – 372	To:EtOAc:DEA (15:75:10)
373 – 376	EtOAc:DEA (9:1)
377 – 416	EtOAc:MeOH:DEA (8:1:1)
417 – 493	EtOAc:MeOH:DEA (5:4:1)

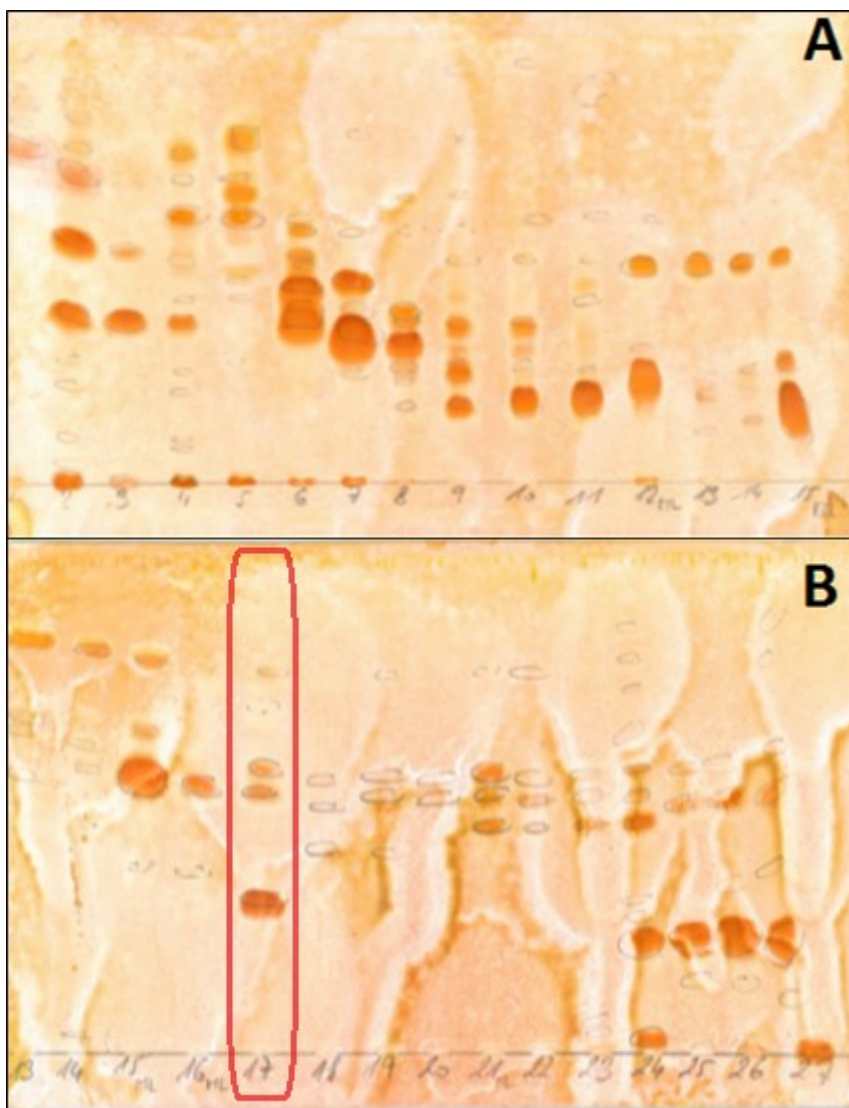
Posléze na základě podobnosti TLC došlo ke slučování frakcí, vzniklo tak 27 podfrakcí (dále jen frakce).

Tabulka 8: Přehled původu nově vzniklých frakcí, použitých mobilních fází a výtěžků připravených k izolaci alkaloidů.

Nově vzniklá frakce	Sloučené frakce	Mobilní fáze	Výtěžek v mg
	1 – 110	Benzín:CHCl ₃ (70:30) Benzín:CHCl ₃ (65:35) Benzín:CHCl ₃ (60:40) Benzín:CHCl ₃ (55:45) Benzín:CHCl ₃ (50:50)	0
1	111 – 145	Benzín:CHCl ₃ (45:55) Benzín:CHCl ₃ (40:60)	10
2	146 – 150	Benzín:CHCl ₃ (40:60)	20
3	151 – 158	Benzín:CHCl ₃ (40:60)	30
4	159 – 173	Benzín:CHCl ₃ (40:60)	70
5	174 – 177	Benzín:CHCl ₃ (40:60)	50
6	178 – 187	Benzín:CHCl ₃ (35:65)	1590
7	188 – 191	Benzín:CHCl ₃ (35:65)	1690
8	192 – 195	Benzín:CHCl ₃ (35:65)	300
9	196 – 199	Benzín:CHCl ₃ (35:65)	80
10	200 – 215	Benzín:CHCl ₃ (35:65) Benzín:CHCl ₃ (30:70)	270
11	216 – 221	Benzín:CHCl ₃ (30:70)	170

Tabulka 8			<i>pokračování</i>
12	222 – 297	Benzín:CHCl ₃ (30:70) Benzín:CHCl ₃ (25:75) Benzín:CHCl ₃ (20:80)	3160
13	298 – 324	Benzín:CHCl ₃ (20:80) CHCl ₃ (100) CHCl ₃ :EtOH (99:1)	310
14	325 – 329	CHCl ₃ :EtOH (99:1)	183
15	330 – 332	CHCl ₃ :EtOH (99:1)	828
16	333 – 336	CHCl ₃ :EtOH (99:1)	616
17	337 – 357	CHCl ₃ :EtOH (99:1)	1206
18	358 – 373	CHCl ₃ :EtOH (98:2)	1426
19	374 – 381	CHCl ₃ :EtOH (98:2)	1388
20	382 – 386	CHCl ₃ :EtOH (98:2)	1134
21	387 – 397	CHCl ₃ :EtOH (98:2)	585
22	398 – 402	CHCl ₃ :EtOH (98:2) CHCl ₃ :EtOH (95:5)	127
23	403 – 408	CHCl ₃ :EtOH (95:5)	182
24	409 – 429	CHCl ₃ :EtOH (95:5) CHCl ₃ :EtOH (90:10)	936
25	430 – 466	CHCl ₃ :EtOH (90:10) CHCl ₃ :EtOH (80:20)	6543
26	467 – 478	CHCl ₃ :EtOH (80:20) CHCl ₃ :EtOH (50:50)	672
27	479 – 493	CHCl ₃ :EtOH (50:50) EtOH (100)	941
			Celkem 24, 517g

Po sloučení a odpaření rozpouštědel, byla zhotovena souhrnná TLC. Frakce č. 1 – 15 byla vyvíjena v soustavě rozpouštědel To:EtOAc:DEA (7:2:1) a frakce č. 13 – 27 v soustavě EtOAc:MeOH:DEA (5:4:1). Souhrnná TLC je znázorněna na následujícím obrázku (Obr. 20).



Obrázek 20: Souhrnná TLC 27 alkaloidních frakcí z extraktu *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, které byla zhotovena z frakcí získaných sloupcovou chromatografií (absorbent A2; dráha 7,5 cm; mobilní fáze: a) To:EtOAc:DEA (7:2:1) b) EtOAc:MeOH:DEA (5:4:1); vyvíjeno 2×, detekce Dragendorffovým činidlem. V této práci jsem zpracovávala zvýrazněnou frakci č. 17.

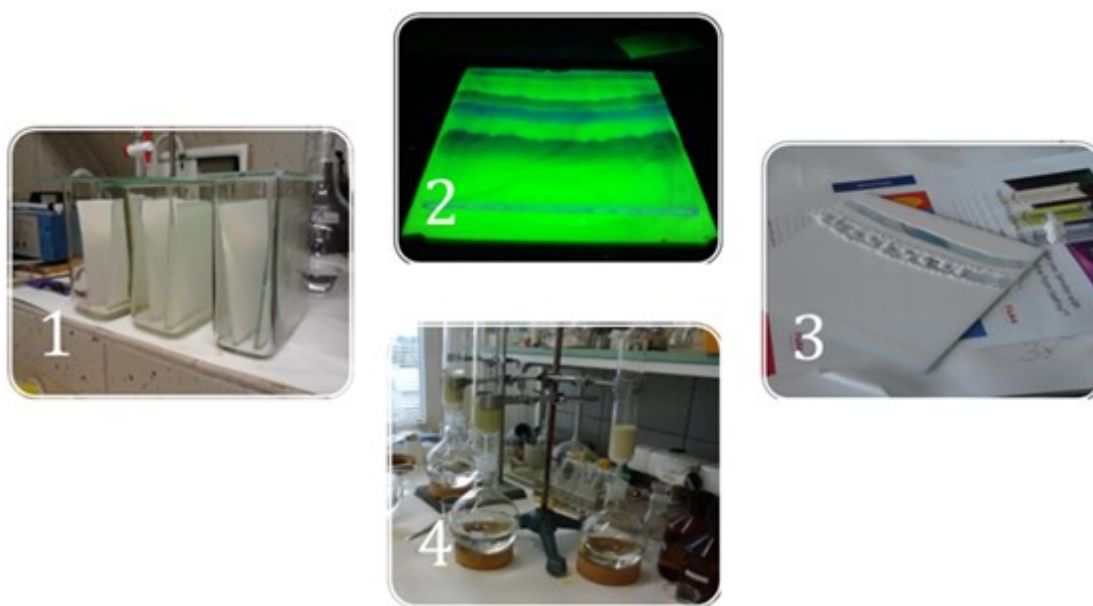
Pro izolaci alkaloidů v čistém stavu byla vybrána frakce č. 17. Před vlastním zahájením izolačních prací byla tato frakce podrobena GC/MS analýze (Obr. 21) za účelem předběžné identifikace látek přítomných ve zpracovaném materiálu.



4.5 Zpracování frakce č. 17

Frakce o celkové hmotnosti 1,206 g byla rozdělena na 3 části a každá z nich se zpracovávala následujícím postupem. Přibližně 400 mg extraktu bylo rozpuštěno v malém množství směsi EtOH + CHCl₃ (1:1) a obsah byl nanesen na skleněné desky asi 1,5 cm od spodní linie a 1 cm od bočních krajů. Baňka byla poté ještě 2× vypláchnuta stejnou směsí a obsah nanesen na tytéž desky. Celkem bylo naneseno 27 desek, která byly podrobeny preparativní TLC analýze.

Desky byly vyvíjeny (Obr. 22/1) v předem nasycených komorách (20-30 minut) v mobilní fázi To:EtOAc:DEA (15:75:10) a poté byly dokonale vysušeny.



Obrázek 22: Obrazová dokumentace postupu práce při zpracování frakce č. 17.

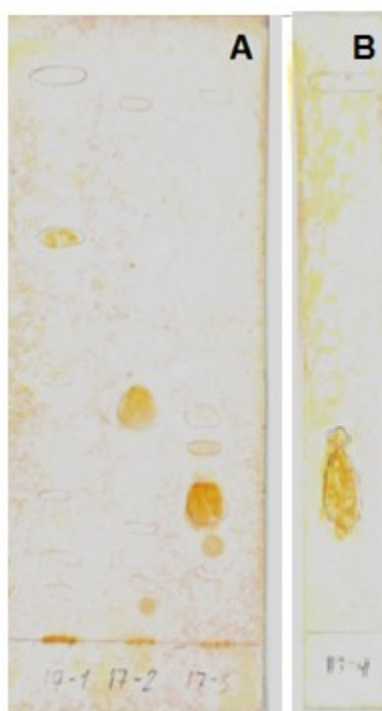
- č. 1: vyvíjení desek v mobilní fázi To:EtOAc:DEA (15:75:10),
- č. 2: zobrazení čtyř alkaloidních zón pod UV detektorem při vlnové délce 254 nm
- č. 3: izolace jednotlivých zón,
- č. 4: eluce izolovaných zón směsí EtOH + CHCl₃ (1:1).

Tento postup byl zopakován ještě jednou. Celkem byly označeny 4 zóny, zobrazené pod UV lampou (Obr. 22/2), izolovány a sloučeny z jednotlivých desek (Obr. 22/3). Každá zóna bylo přečištěna od hrubých nečistot přes vrstvu křemeliny, na kterou byl umístěn separovaný silikagel z desek promísený s křemelinou v poměru 1:1. Takto připravená směs byla promývána směsí EtOH + CHCl₃ (1:1) do doby detekovatelných alkaloidů v odkapávajícím eluátu (Obr. 22/4). Veškerý eluát byl odpařen na odparce a kvantitativně převeden do malých uzavíratelných baněk,

které byly nadále uchovávány v lednici. Takto byly získány podfrakce označené jako 17/1 – 17/4. Jejich hmotnosti jsou uvedené v tabulce (Tab. 9).

Tabulka 9: Hmotnosti izolovaných podfrakcí získaných z frakce č. 17 *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN

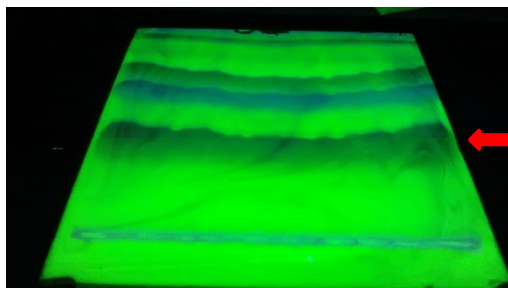
Podfrakce	Hmotnost
17/1	94,5 mg
17/2	154,6 mg
17/3	187,9 mg
17/4	Neváženo, ihned krystalizace – další zpracování



Obrázek 23: TLC chromatogramy izolovaných zón. Obr. A: Zóny 17/1 – 17/3 vyvíjeny v soustavě *TO:EtOAc:DEA* 15:75:10 (2×); Obr. B: Zóna 17/4 v soustavě *TO:EtOAc:DEA* 15:75:10 (2×), *cHx:DEA* (9:1).

Zpracování podfrakce č. 17/4 probíhalo následujícím způsobem. Již při převedení eluátu ze zóny 4 a následném odpařování došlo ke vzniku viditelných krystalů. Po dobu 5 následujících dní probíhala krystalizace za horka z ethanolu pod

zpětným chladičem. Celkem bylo získáno 127 mg čisté látky, která byla podrobena strukturní identifikaci.

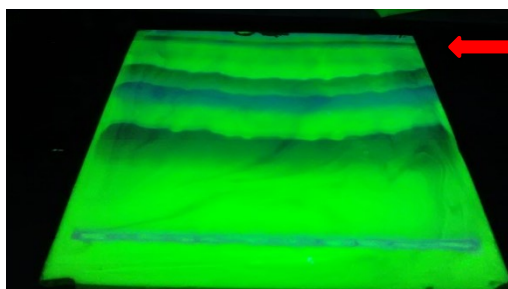


Obrázek 24: analyzovaná zóna 17-4



Obrázek 25: TLC chromatogram čisté látky izolované ze zóny 17-4, vyvíjecí soustavy: $TO:EtOAc:DEA\ 15:75:10\ (2\times)$, $CHx:DEA\ 9:1$

Zóna č. 17/1 o hmotnosti 94,5 mg byla podrobena preparativní TLC za využití mobilní fáze $TO:DEA\ (9:1)$. Opět byly detekovány 4 zóny, které byly izolovány stejným postupem jako počáteční frakce č. 17. Zpracovávány byly nadále zóny 17/1-3 a 17/1-4.



Obrázek 26: analyzovaná zóna 17-1

Zóna 17/1-3 o celkové hmotnosti 32,2 mg byla dočišťována na komerčních deskách v mobilní fázi $TO:DEA\ (9:1)$ a v konečné fázi přečištěna eluční metodou prostřednictvím $CHCl_3$ přes SILPEARL. V eluátu však bylo detekováno prostřednictvím GC/MS malé množství ftalátů, nikoliv alkaloidů.

Zóna 17/1-4 s hmotností 13,1 mg byla vyvíjena v mobilní fázi $TO:Aceton:EtOH:Amoniak\ (40:40:6:2)$ a byla získána jedna dílčí zóna o hmotnosti

3,1 mg, nejednalo se však o čistou látku. Další zpracování této zóny již nebylo předmětem této práce.

4.6 Metody použití pro identifikaci alkaloidů

4.6.1 GC/MS analýza

Analýza získaných alkaloidů z rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN provedena prostřednictvím plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 inert pracující s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separace byla provedena na koloně HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Během analýzy byl použit tento teplotní režim: 100 °C – 180 °C (15 °C/min), 180 °C (stabilizace 1 minutu), 180 – 300 °C (5 °C/min), 300 °C (stabilizace 15 minut). Průtoková rychlost helia jako nosného plynu byla 0,8 ml/min. Při teplotě 280 °C byl proveden nástřik vzorku (alkaloidního roztoku) v množství 1 μl. Koncentrace roztoku byla 1 mg/μl a split 1:10.

Identifikace alkaloidů byla provedena porovnáním hmotnostních spekter s daty dostupnými v komerční knihovně spekter NIST, se spektry publikovanými v literatuře a rovněž se spektry získanými v laboratoři Katedry farmaceutické botaniky a ekologie na Faf UK v HK.

4.6.2 Nukleární magnetická rezonance

NMR spektra (¹H-NMR a ¹³C-NMR) byla měřena na přístroji Bruker Avance DRX 500 Spectrometer operating, jehož pracovní frekvence je 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C. Měření bylo prováděno v deuteriochloroformu (CDCl₃) při teplotě 25 °C. Chemické posuny δ byly zaznamenávány v jednotkách pars per milion (ppm). Hodnoty ¹H-NMR spektra jsou vztaženy k inertnímu standardu (tetramethylsilan; 7,26 ppm) a hodnoty ¹³C-NMR spektra k signálu solventu (77,0 ppm).

4.6.3 Optická otáčivost

Měření optické otáčivosti alkaloidů probíhalo v jejich chloroformových roztocích na polarimetru P3000. Specifická otáčivost byla vypočítána podle vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

t – teplota měření; D – sodíková čára D čára = 589,3 nm; α – naměřená otáčivost [°];
c – koncentrace měřeného alkaloidu [$\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$]; l – délka kyvety [dm].

4.7 Spektrum biologické aktivity a její stanovení

4.7.1 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity vůči AChE/ BuChE

Měření cholinesterázové inhibiční aktivity vůči humánní erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měřením se zabýval prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Příprava hemolyzátu a plazmy:

K přípravě je jako zdroj acetylcholinesterázy (HuAChE) použit hemolyzát lidských erytrocytů. Lidská plazma je potom zdrojem butyrylcholinesterázy (HuBuChE). Erytrocyty se získají z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru se krev stejnoměrně rozdělí po 5 ml do šroubovacích zkumavek a provede se centrifugace rychlostí 4000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Po první centrifugaci se plazma odsaje tak, aby v ní nebyly erytrocyty a uchovává se do doby stanovení aktivity BuChE v chladničce při 4 °C. Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu se opatrně odsaje, odečte se objem erytrocytární masy a tento sediment se zředí takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby byl objem suspenze 13 ml. Obsah se dobře promíchá a opět se provede centrifugace stejným způsobem. Takovéto promytí se provede celkem 3× a promývací kapalina se dokonale odstraní. Poté se přidá takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erytrocyty:pufr 1:8 – 9. Směs se opět homogenizuje, přelije do Erlenmayerovy baňky a erytrocyty se ponechají spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem rychlostí 300 ot./min. Ihned po skončení této řízené hemolýzy se u suspenze stanoví acetylcholinesterázová aktivita, případně se 5 mM fosfátovým pufrem upraví absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08 – 0,15) a naředěný hemolyzát se uchovává do doby použití při teplotě -22 °C. Butyrylcholinesterázová aktivita plazmy se stanoví obdobným způsobem (hodnota absorbance musí být 0,15 – 0,20) a uchovává se stejně jako hemolyzát.

Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů:

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [$\lambda = 436 \text{ nm}$ (AChE)/ $\lambda = 412 \text{ nm}$ (BuChE)]. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC_{50} jsou vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPaD 56 Software, San Diego, CA, USA). Výsledky jsou následně porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz: galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou vypočítána podle vzorce:

$$\%I = 100 - [100 \times (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA})]$$

% I – procento inhibice; ΔA_{BL} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min;
 ΔA_{SA} – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Stanovení aktivity enzymů:

Do 6 jamek mikrotitračních destiček se napipetuje 8,3 μl plazmy nebo hemolyzátu, přidá se 283 μl 5 mM DTNB, 8,3 μl DMSO, po jednominutovém promíchání na mikrotřepačce se směs inkubuje v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Potom se přidá 33,3 μl roztoku substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10 mM butyrylthiocholinjodidu) a zjistí se při příslušné vlnové délce absorbance (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm). Obvyklým způsobem se vypočte rozdíl a stanoví průměr se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek:

Použijí se stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), stejný postup měření a použijí se koncentrace látky: 40 mM, 10, 4, 1, 0,4, případně další série koncentrací v tomto početním modu, je-li aktivita vysoká. Do poslední 6. řady se pipetuje DMSO jako slepý vzorek. Získané inhibiční aktivity IC_{50} HuAChE a IC_{50} HuBuChE pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem ($IC_{50, \text{HuAChE}} = 1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} = 42,301 \pm 0,065 \mu\text{M}$), huperzinem A ($IC_{50, \text{HuBuChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{HuBuChE}} >$

1000 μM) a berberinem ($\text{IC}_{50, \text{HuAChE}} = 0,705 \pm 0,104 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50, \text{HuBuChE}} = 30,721 \pm 3,492 \mu\text{M}$)

4.7.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidáze (POP)

Měření inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidáze bylo provedeno ve spolupráci s Centrem pokročilých studií, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany Hradec Králové.

POP byla rozpuštěna v pufovaném fyziologickém roztoku PBS, specifická aktivita enzymu byla $0,2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Testování aktivit bylo provedeno na polystyrenové mikrotitrační destičce s rovným a průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny jejich rozpuštěním v DMSO (10 mM). Roztoky pro testování ($10^{-3} - 10^{-7} \text{ M}$) byly připraveny ředěním zásobních roztoků superčistou vodou, slepé vzorky byly použity o stejné koncentraci DMSO. Jako substrát pro testování inhibiční aktivity byl použit Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 170 μl PBS, 5 μl roztoku testované látky o určité koncentraci a 5 μl roztoku POP. Následně došlo k inkubaci po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno do každé jamky 20 μl substrátu a směs byla znovu inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Sleduje se vznik *p*-nitroanilinu, který je přímo úměrný aktivitě POP a je měřen spektrofotometricky při $\lambda = 405 \text{ nm}$ na microplate ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC_{50} . Získané inhibiční aktivity testovaných látek byly porovnány s hodnotami IC_{50} referenčních látek berberinu ($\text{IC}_{50} = 142,3 \pm 21,1 \text{ mM}$) a Z-Pro-prolinalu ($\text{IC}_{50} = 3,269 \pm 0,021 \text{ mM}$).

4.7.3 Stanovení antimalarické aktivity

Antimalarická aktivita byla měřena v rámci spolupráce s Universitou v Lisabonu. Podrobný popis této metody je možno nalézt v následující publikaci [62].

4.7.4 Stanovení cytotoxické aktivity

Cytotoxická aktivita byla stanovena v rámci spolupráce s Českou zemědělskou univerzitou v Praze. Tyto testy prováděl Ing. Ivo Doskočil, Ph.D. za využití MTT metodiky. Testování proběhlo na dvou typech buněčných nádorových

liniích. Jednalo se o nádorové buňky střevního epitelu Caco-2 a Ht-29. Testování byly podrobeny i normální buňky střevního epitelu FHS-74Int.

Kultivace nádorových buněk střevního epitelu Caco-2 a Ht-29:

Buněčné linie kolorektálního karcinomu (Caco-2 a Ht-29) byly pěstovány v DMEM mediu, které je složeno z 10% FBS, 1% roztoku penicilinu a streptomycinu, 1% roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 1% roztoku pyruvátu sodného a 1% roztoku neesenciálních aminokyselin. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm³) s 15 ml DMEM media, které byly vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou (5% CO₂ a teplota 37 °C). Medium bylo měněno každé dva dny. Buňky byly sklizeny sedmý den pomocí trypsinu a centrifugovány po dobu 10 minut, při 200 × g. Staré medium bylo odstraněno a buňky byly naředěny novým. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a doplněno 15 ml novým DMEM mediem v nové kultivační láhvi pro další kultivaci.

Kultivace normální buněk střevního epitelu FHS-74Int:

Postup kultivace buněk střevního epitelu FHS-74Int byl obdobný s výše popsáním s rozdílem ve složení media. Medium bylo složeno následovně: DMEM medium s 10% FBS, 1% roztok penicilinu a streptomycinu, 30 ng/ml epidermální růstový faktor, 1% roztok neesenciálních aminokyselin.

Samotný test cytotoxicity (MTT) probíhal následovně:

Buňky byly naředěné na koncentraci $2,5 \times 10^3$ a pipetovány do 96-jamkové destičky v množství 200 µl. Po 24 hodinách bylo odstraněno staré medium a přidáno 100 µl nové medium spolu s testovanými vzorky v daných koncentracích (100-0,05 µM/ml). Takto byly testované vzorky s buňkami inkubovány po dobu 72 h. Po této době bylo medium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 µl čistým mediem s MTT (1 µg/ml). Po 2 hodinách v CO₂ inkubátoru bylo medium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s kontrolou, kde byly buňky bez přidání testovaných látek.

5 VÝSLEDKY

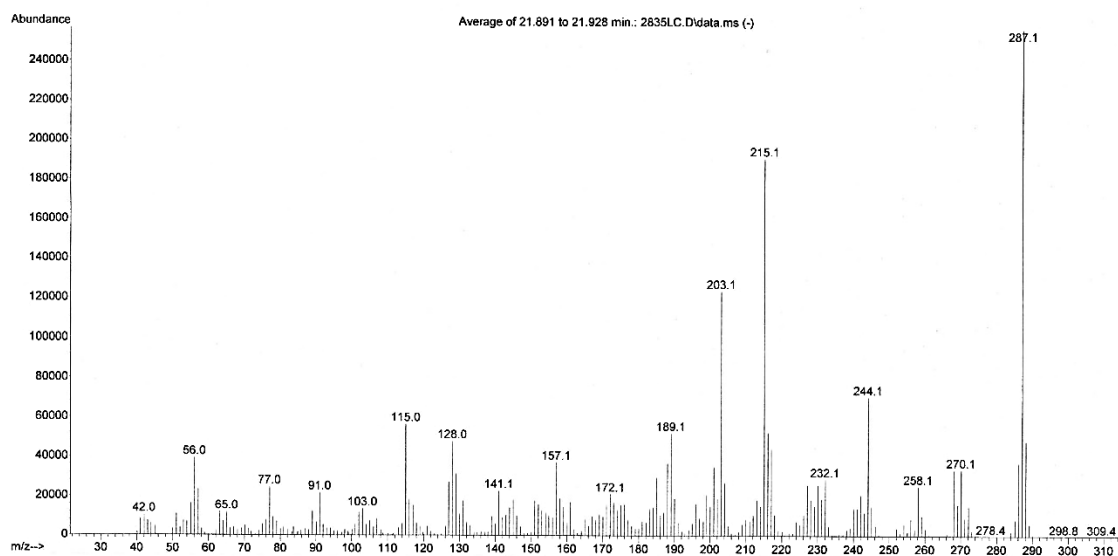
V rámci této práce bylo získáno 127 mg čisté látky, označené jako 17/4, která byla identifikována porovnáním získaných MS a NMR dat s daty publikovanými v literatuře jako epimaritidin [63]. Tento alkaloid byl přítomen pouze ve frakci č. 17, konkrétně v zóně č. 4. Nadále byl podroben řadě biologických testů. Ostatní alkaloidy nebyly izolovány v rámci této diplomové práce nebo se jejich izolace nepodařila.

5.1 Strukturní analýza epimaritidinu

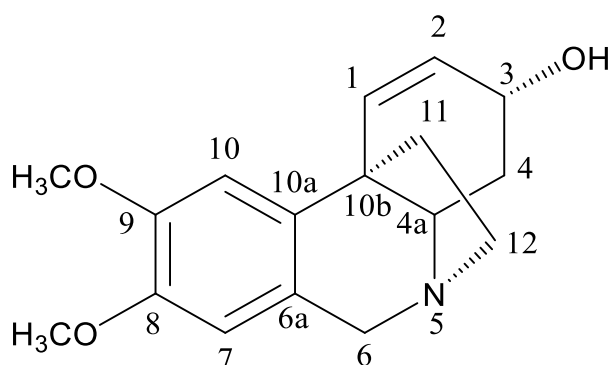
5.1.1 MS studie epimaritidinu

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 287(100), 270(15), 258(10), 244(30), 215(75), 202(50), 203(50), 189(20).

Obrázek 27: EI-MS spektrum epimaritidinu



5.1.2 NMR studie epimaritidinu



Obrázek 28: Epimaritidin

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře [63].

5.1.2.1 ^1H -NMR spektrum epimaritidinu

^1H NMR (499.9 MHz; δ , CDCl_3 , 25°C):

6.81 (1H, s, H_{10}), 6.52 (1H, s, H_7), 6.50 (1H, dd, $J = 10.2, 2.1$ Hz, H_1), 5.80 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H_2), 4.44 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H_6), 4.46 (1H, m, H_3), 3.88 (3H, s, OMe), 3.82 (3H, s, OMe), 3.81 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H_6), 3.45 (1H, ddd, $J = 14.3, 10.5, 4.6$ Hz, H_{12}), 3.27 (1H, dd, $J = 13.2, 3.2$, H_{4a}), 2.94 (1H, ddd, $J = 14.3, 8.9, 5.8$ Hz, H_{12}), 2.26 – 2.05 (3H, m, $\text{H}_4, \text{H}_{11}, \text{H}_{11}$), 1.63 (1H, ddd, $J = 12, 12, 12$ Hz, H_4).

5.1.2.2 ^{13}C -NMR spektrum epimaritidinu

^{13}C NMR (125.7 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

147.4 (C_8, C_9), 137.5 (C_{10a}), 131.5 (C_2), 128.9 (C_1), 124.7 (C_{6a}), 107.9 (C_7), 105.6 (C_{10}), 67.7 (C_3), 66.8 (C_{4a}), 61.9 (C_6), 56.1 (OMe), 55.9 (OMe), 53.3 (C_{12}), 45.1 (C_{11}), 44.1 (C_{10b}), 35.0 (C_4).

5.1.3 Optická otáčivost epimaritidinu

$$[\alpha]_D^{25} = -127,6^\circ$$

5.1.4 Biologická aktivita epimaritidinu ve vztahu k Alzheimerově chorobě

Výsledky *in vitro* testů inhibice erytrocytární acetylcholinesterázy a sérové butyrylcholinesterázy jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 10)

Tabulka 10: *In vitro* inhibiční aktivita epimaritidinu vůči HuAChE a HuBuChE

Alkaloid	IC ₅₀ , HuAChE (μM)	IC ₅₀ , HuBuChE (μM)
Epimaritidin	> 1000	> 1000
Galanthamin ^R	1,71 ± 0,065	42,301 ± 0,065
Huperzin A ^R	0,033 ± 0,001	> 1000
Berberin ^R	0,705 ± 0,104	30,721 ± 3,492

^R = Referenční látka

Výsledky testů inhibice prolyl oligopeptidázy jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 11).

Tabulka 11: Inhibiční aktivita epimaritidinu vůči POP

Alkaloid	IC ₅₀ , POP (mM)
Epimaritidin	0,79 ± 0,4
Berberin	0,14 ± 0,02
Z-Pro-prolinal ^R	2,75 · 10 ⁻⁶ ± 0,00 · 10 ⁻⁶

^R = Referenční látka

5.1.6 Antimalarická aktivita epimaritidinu

Epimaritidin se v měření antimalarické aktivity prokázal jako neaktivní.

5.1.7 Cytotoxická aktivita epimaritidinu

Epimaritidin se v měření cytotoxické aktivity vůči p-53 negativním buněčným liniím kolorektálního karcinomu (Caco-2 a Ht-29) a vůči normálním buňkám střevního epitelu FHS-74Int prokázal jako neaktivní.

6 DISKUSE

Předmětem předložené diplomové práce bylo zpracování čerstvých cibulí pěstovaného kultivaru rostliny rodu *Narcissus*, konkrétně *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. Jedná se o kultivar narcisu, který patří podle zahradnického třídění narcisů do skupiny II: narcisy s velkou pakorunkou [17]. Tato skupina narcisů je velmi početná, zahrnuje odrůdy s pakorunkami nejrůznějších forem.

Rostlina byla pro fytochemickou studii vybrána na základě rozsáhlého screeningu, který byl proveden v minulých letech na KFBE. Tento screening zahrnoval cca 80 různých kultivarů rostlin rodu *Narcissus*. Z každé rostliny byl připraven alkaloidní extrakt, který byl podroben GC/MS analýze za účelem zjištění alkaloidního profilu a dále byl podroben studiu na inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám. Na základě získaných výsledků, předchozích studiích, dostupnosti a ceně byla vybrána zmíněná rostlina. GC/MS analýza ukázala přítomnost látek, které nebyly doposud na KFBE izolovány, dále některé alkaloidy se nepodařilo identifikovat. Předpokládali jsme, že by se mohlo jednat o nové, doposud nepopsané látky.

V rámci vlastních experimentů bylo nejprve zpracováno 34 kg čerstvých cibulí. Za využití acidobazických vlastností byl připraven koncentrovaný alkaloidní extrakt (31,73 g). Alkaloidní extrakt byl dále dělen pomocí sloupcové chromatografie a bylo připraveno 27 frakcí, které byly zpracovávány za účelem izolace alkaloidů v čistém stavu. Pro vlastní izolaci alkaloidů mi byla přidělena frakce 17. Tato frakce byla nejprve podrobena GC/MS analýze. Bylo zjištěno, že jsou přítomny 3 Amaryllidaceae alkaloidy, z nichž se v té době podařilo identifikovat pouze tazettin. Frakce byla zpracována pomocí preparativní TLC, cílem bylo získat neidentifikované látky. Po dvojnásobném provedení preparativní TLC se podařilo izolovat jednu látku v čistém stavu ve formě bílých krystalů (127 mg). Na základě strukturní analýzy (NMR, MS) byla látka identifikována jako α krininový alkaloid epimaritidin [63]. Tento alkaloid byla prozatím izolován pouze z cibulí *Zephyranthes rosea* [63]. Jedná se tedy o sloučeninu vyskytující se v rostlinách čeledi Amaryllidaceae v minoritním množství. Této látce nebyla v literatuře doposud věnována pozornost z pohledu její biologické aktivity. Druhá látka byla na základě MS analýzy identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu

hippeastrin. Tato látka byla již na KFBE izolována v gramovém množství. Její izolaci nebyla věnována další pozornost, neboť se ve frakci 17 vyskytovala ve stopovém množství. To samé platí i pro již zmíněný tazettin.

Látka byla izolována v množství, které umožňovalo provedení celé škály biologických testů. Prvním z provedených testů, byla studie na inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám za využití Ellmanovy metody. Bohužel látka nevykázala žádnou inhibici těchto enzymů. Dalším testem byla inhibice POP, kde byla zjištěna mírná aktivita ($IC_{50} = 0,79 \pm 0,4$). Oba tyto testy mají souvislost s terapií AD. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, Amaryllidaceae alkaloidům je stále věnována pozornost z pohledu jejich AChE inhibice.

Epimaritidin byl dále screeningově testován na dvě nádorové linie kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT-29) a současně na jedné zdravé linii (FHS-74Int.) za účelem stanovení celkové toxicity.

V rámci nově navázané spolupráce s Univerzitou v Lisabonu byla izolovaná látka testována na antimalarickou aktivitu (jaterní stadium *P. berghei*).

Bohužel ani v jedné z těchto studií nebyla zjištěna zajímavá biologická aktivita.

V budoucnu bude ještě v rámci spolupráce s Českou zemědělskou univerzitou v Praze testována antibakteriální a antifungální aktivita.

Závěrem je možné konstatovat, že epimaritidin je látka z pohledu doposud zjištěných biologických aktivit nezajímavá.

7 LITERATURA

1. Basu T, Mallik A, Mandal N: **Evolving importance of anticancer research using herbal medicine: a scientometric analysis.** *Scientometrics* 2017, **110**(3):1375-1396.
2. Stewart BW, Bray F, Forman D, Ohgaki H, Straif K, Ullrich A, Wild CP: **Cancer prevention as part of precision medicine: 'plenty to be done'.** *Carcinogenesis* 2016, **37**(1):2-9.
3. Cahlikova L, Dorskocil I, Hostalkova A, Benesova N, Safratova M: **Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells.** *Planta Medica* 2015, **81**(16):1425-1426.
4. Takos AM, Rook F: **Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use.** *International Journal of Molecular Sciences* 2013, **14**(6):11713-11741.
5. Song JH, Zhang L, Song Y: **Alkaloids from *Lycoris aurea* and their cytotoxicities against the head and neck squamous cell carcinoma.** *Fitoterapia* 2014, **95**:121-126.
6. Furst R: **Narciclasine - an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties.** *Planta Medica* 2016, **82**(16):1389-1394.
7. Dalecka M, Havelek R, Kralovec K, Bruckova L, Cahlikova L: **Amaryllidaceae family alkaloids as potential drugs for cancer treatment.** *Chemicke Listy* 2013, **107**(9):701-708.
8. Kilgore MB, Kutchan TM: **The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery.** *Phytochemistry Reviews* 2016, **15**(3):317-337.
9. Nair JJ, Bastida J, van Staden J: ***In vivo* cytotoxicity studies of Amaryllidaceae alkaloids.** *Natural Product Communications* 2016, **11**(1):121-132.
10. Jahodar, L: **Farmakobotanika: semenné rostliny.** Praha 2009: Karolinum.
11. Ingrassia L, Lefranc F, Mathieu V, Darro F, Kiss R: **Amaryllidaceae isocarbostryril alkaloids and their derivatives as promising antitumor agents.** *Translational Oncology* 2008, **1**(1):1-13.
12. He MM, Qu CR, Gao OD, Hu XM, Hong XC: **Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids.** *RSC Advances* 2015, **5**(21):16562-16574.
13. Berkov S, Georgieva L, Kondakova V, Viladomat F, Bastida J, Atanassov A, Codina C: **The geographic isolation of *Leucojum aestivum* populations leads to divergation of alkaloid biosynthesis.** *Biochemical Systematics and Ecology* 2013, **46**:152-161.
14. Cabezas F, Ramirez A, Viladomat F, Codina C, Bastida J: **Alkaloids from *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae).** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2003, **51**(3):315-317.
15. Tian YQ, Zhang CY, Guo MQ: **Comparative analysis of Amaryllidaceae alkaloids from three *Lycoris* species.** *Molecules* 2015, **20**(12):21854-21869.
16. Crouch NE, Mulholland DA, Pohl TL, Ndlovu E: **The ethnobotany and chemistry of the genus *Clivia* (Amaryllidaceae).** *South African Journal of Botany* 2003, **69**(2):144-147.
17. Vanek, V: **Tulipány, narcisy, hyacinty.** Praha 1974: Státní zemědělské nakladatelství.

18. Berkov S, Martinez-Frances V, Bastida J, Codina C, Rios S: **Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus***. *Phytochemistry* 2014, **99**:95-106.
19. <http://botanika.wendys.cz/images/stories/305/0305.jpg>, staženo 4. ledna 2017
20. <http://www.biolib.cz/IMG/GAL/175565.jpg>, staženo 4. ledna 2017
21. <http://plantsrescue.com/wp-content/uploads/2014/06/Narcissus-tazetta.jpg>, staženo 4. ledna 2017
22. Evidente A, Kornienko A: **Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives**. *Phytochemistry Reviews* 2009, **8**(2):449-459.
23. http://hbc.bas-net.by/bcb/images/expon/10669_gib.jpg, staženo 25. března 2016
24. Cahlikova L: **Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva, Habilitační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**. Hradec Králové, 2014.
25. Machocho AK, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Brun R, Chhabra SC: **Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii***. *Phytochemistry* 2004, **65**(23):3143-3149.
26. Emir A, Emir C, Bozkurt B, Onur MA, Bastida J, Somer NU: **Alkaloids from *Galanthus fosteri***. *Phytochemistry Letters* 2016, **17**:167-172.
27. Cahlikova L, Benesova N, Macakova K, Kucera R, Hrstka V, Klimes J, Jahodar L, Opletal L: **Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity**. *Natural Product Communications* 2012, **7**(5):571-574.
28. Liu ZM, Huang XY, Cui MR, Zhang XD, Chen Z, Yang BS, Zhao XK: **Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-inflammatory activities**. *Fitoterapia* 2015, **101**:188-193.
29. Min BS, Gao JJ, Nakamura N, Kim YH, Hattori M: **Cytotoxic alkaloids and a flavan from the bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum***. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2001, **49**(9):1217-1219.
30. de Andrade JP, Berkov S, Viladomat F, Codina C, Zuanazzi JAS, Bastida J: **Alkaloids from *Hippeastrum papilio***. *Molecules* 2011, **16**(8):7097-7104.
31. Habartova K, Cahlikova L, Rezacova M, Havelek R: **The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity**. *Natural Product Communications* 2016, **11**(10):1587-1594.
32. Nair JJ, Bastida J, Viladomat F, van Staden J: **Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids**. *Natural Product Communications* 2013, **8**(5):553-564.
33. Nair JJ, Van Staden J: **Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the South African medicinal plant *Boophone disticha* (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae)**. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, **151**(1):12-26.
34. Cedron JC, Ravelo AG, Leon LG, Padron JM, Estevez-Braun A: **Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids**. *Molecules* 2015, **20**(8):13854-13863.
35. Giordani RB, de Andrade JP, Verli H, Dutilh JH, Henriques AT, Berkov S, Bastida J, Zuanazzi JAS: **Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae)**. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2011, **49**(10):668-672.

36. Masi M, Frolova LV, Yu X, Mathieu V, Cimmino A, De Carvalho A, Kiss R, Rogelj S, Pertsemliadis A, Kornienko A *et al*: **Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla* quail, with activity against drug-resistant cancer.** *Fitoterapia* 2015, **102**:41-48.
37. Nair JJ, Rarova L, Strnad M, Bastida J, van Staden J: **Mechanistic insights to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids.** *Natural Product Communications* 2015, **10**(1):171-182.
38. Nair JJ, van Staden J: **Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the amaryllidaceae.** *Natural Product Communications* 2014, **9**(8):1193-1210.
39. Hohmann J, Forgo P, Molnar J, Wolfard K, Molnar A, Thalhammer T, Mathe I, Sharples D: **Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*.** *Planta Medica* 2002, **68**(5):454-457.
40. Liu J, Hu WX, He LF, Ye M, Li Y: **Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis.** *Febs Letters* 2004, **578**(3):245-250.
41. Liu J, Li Y, Tang LJ, Zhang GP, Hu WX: **Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2007, **61**(4):229-234.
42. Li Y, Liu J, Tang LJ, Shi YW, Ren W, Hu WX: **Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest.** *Oncology Reports* 2007, **17**(2):377-384.
43. Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calve B, Wauthoz N, Megalizzi V, Gras T, Bruyere C, Dubois J *et al*: **Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2009, **52**(20):6244-6256.
44. Cao ZF, Yu D, Fu SL, Zhang GC, Pan YY, Bao MM, Tu J, Shang BX, Guo PD, Yang P *et al*: **Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity.** *Toxicology Letters* 2013, **218**(2):174-185.
45. Nair JJ, Bastida J, Viladomat F, van Staden J: **Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids.** *Natural Product Communications* 2012, **7**(12):1677-1688.
46. Ali AA, Ramadan MA, Frahm AW: **Alkaloidal constituents of *Crinum-bulbispermum* .3. Bulbispermone, a new alkaloid of *Crinum-bulbispermum*.** *Planta Medica* 1984, **50**(5):424-427.
47. Luchetti G, Johnston R, Mathieu V, Lefranc F, Hayden K, Andolfi A, Lamoral-Theys D, Reisenauer MR, Champion C, Pelly SC *et al*: **Bulbispermone: a crinine-type Amaryllidaceae alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells.** *ChemMedChem* 2012, **7**(5):815-822.
48. Nair JJ, Rarova L, Strnad M, Bastida J, van Staden J: **Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012, **22**(19):6195-6199.

49. Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, Bruckova L, Cahlikova L, Dalecka M, Vavrova J, Rezacova M, Opletal L, Bilkova Z: **The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells.** *Phytomedicine* 2014, **21**(4):479-490.
50. Guo GL, Yao GM, Zhan GQ, Hu YF, Yue M, Cheng L, Liu YP, Ye Q, Qing GL, Zhang YH *et al*: **N-methylhemeanthidine chloride, a novel Amaryllidaceae alkaloid, inhibits pancreatic cancer cell proliferation via down-regulating AKT activation.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014, **280**(3):475-483.
51. Dumont P, Ingrassia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R: **The amaryllidaceae isocarbostryril narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts.** *Neoplasia* 2007, **9**(9):766-776.
52. Van Goietsenoven G, Hutton J, Becker JP, Lallemand B, Robert F, Lefranc F, Pirker C, Vandenbussche G, Van Antwerpen P, Evidente A: **Targeting of eEF1A with Amaryllidaceae isocarbostryrils as a strategy to combat melanomas.** *Faseb Journal* 2010, **24**(11):4575-4584.
53. Kekre N, Griffin C, McNulty J, Pandey S: **Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2005, **56**(1):29-38.
54. Griffin C, Hamm C, McNulty J, Pandey S: **Pancratistatin induces apoptosis in clinical leukemia samples with minimal effect on non-cancerous peripheral blood mononuclear cells.** *Cancer Cell International* 2010, **10**:7.
55. Griffin C, McNulty J, Pandey S: **Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells.** *International Journal of Oncology* 2011, **38**(6):1549-1556.
56. Griffin C, Karnik A, McNulty J, Pandey S: **Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2011, **10**(1):57-68.
57. Konrath EL, Passos CD, Klein LC, Henriques AT: **Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013, **65**(12):1701-1725.
58. Cortes N, Posada-Duque RA, Alvarez R, Alzate F, Berkov S, Cardona-Gomez GP, Osorio E: **Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study.** *Life Sciences* 2015, **122**:42-50.
59. Kulhankova A, Cahlikova L, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Opletal L: **Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity.** *Chemistry & Biodiversity* 2013, **10**(6):1120-1127.
60. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ: **Acetylcholinesterase inhibitors from plants.** *Phytomedicine* 2007, **14**(4):289-300.
61. Masi M, Cala A, Tabanca N, Cimmino A, Green IR, Bloomquist JR, van Otterlo WAL, Macias FA, Evidente A: **Alkaloids with activity against the zika virus vector *Aedes aegypti* (L.)-crinsarnine and sarniensinol, two new crinine and mesembrine type alkaloids isolated from the south African plant *Nerine sarniensis*.** *Molecules* 2016, **21**(11).

62. Safratova M, Hostalkova A, Hulcova D, Breiterova K, Hrabcova V, Machado M, Fontinha D, Prudencio M, Kunes J, Chlebek J, Jun D, Hrabanova M, Novakova L, Havelek R, Seifrtova M, Opletal L, Cahlikova L: **Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity.** In. RSC Advances, 2017, submitted manuscript.
63. Ghosal S, Ashutosh, Razdan S: **Chemical-constituents of Amaryllidaceae .9. (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes-rosea*.** *Phytochemistry* 1985, **24**(3):635-637.

8 SEZNAM ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
Al ₂ O ₃	oxid hlinitý
A549	buňky plicního karcinomu
B16F10	buňky myšího melanomu
BJ	lidské zdravé fibroblasty
BL6	buňky myšího melanomu
BuChE	butyrylcholinesteráza
BxPC-3	rakovinné buňky pankreatu
Caco-2	buňky kolorektálního karcinomu
CHCl ₃	chloroform
CHx	cyklohexan
CH ₂ Cl ₂	dichlormethan
DEA	diethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
ED ₅₀	dávka, která se projeví u 50 % populace
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
G-361	maligní melanom
HCl	kyselina chlorovodíková
HeLa	lidský adenokarcinom děložního hrdla
HepG2	buňky jaterního hepatocelulárního karcinomu
Hey1B	lidské nádorové buňky vaječníků
HL-60	akutní premyelocytární leukemické buňky
Hs683	buňky anaplastického oligodendrogliomu
HSC-2	krevní kmenové buňky
HT-29	buňky kolorektálního karcinomu
HuAChE	humánní acetylcholinesteráza
HuBuChE	humánní butyrylcholinesteráza
IC ₅₀	Koncentrace působící 50% inhibici

Jurkat	T-lymfoblastová leukemie
KFBE	Katedra farmaceutické botaniky a ekologie (UK)
KM3	lidský mnohočetný karcinom
K562	chronická myeloidní leukemie
LLC	myší buňky plicního karcinomu
LoVo	buněčné linie kolorektálního karcinomu
MCF-7	rakovinné buňky prsu
MeOH	methanol
Meth-A	buňky myšího sarkomu
MOLT-4	lidské leukemické buňky
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný
Na ₂ SO ₄	síran sodný
NCI	národní institut rakoviny
NH ₃	amoniak
NK buňky	cytotoxické buňky, které jsou součástí imunitního systému
OE21	rakovinné buňky jícnu
PBMCs	periferní krevní mononukleární buňky
PC-3	rakovinné buňky prostaty
S37	murine sarcoma
SKMEL-28	buňky lidského kožního melanomu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF	tumor nekrotizující faktor
To	toluen
U373	zhoubný nádor mozku

ABSTRAKT

Dohnalová A: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita I, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2017, 64 s.

Čeled' Amaryllidaceae zahrnuje cibulovité, nádherně kvetoucí rostliny, které jsou po tisíce let využívány v tradiční medicíně. Hlavní sloučeniny, které můžeme v těchto rostlinách nalézt, jsou alkaloidy. Do dnešní doby je již známo přes 500 isochinolinových alkaloidů, které vykazují rozmanitou biologickou aktivitu včetně protinádorové, antibakteriální, inhibiči acetylcholinesterázy a další.

Náplní diplomové práce bylo zpracování 34 kg čerstvých cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN a příprava ethanolického a posléze alkaloidního extraktu. Ten byl dále rozdělen sloupcovou chromatografií na téměř 500 frakcí, které byly na základě podobnosti sloučeny do 27 podfrakcí. Pro izolaci alespoň jednoho alkaloidu v čistém stavu byla vybrána podfrakce č. 17. K jejímu dalšímu dělení byla využita metoda preparativní TLC. Podařilo se získat jednu látku v čisté krystalické formě, která byla podrobena strukturní analýze prostřednictvím EI-MS a NMR. Dále byly provedeny studie biologické aktivity ve spolupráci s dalšími pracovišti.

Izolovaný alkaloid byl identifikován jako epimaritidin. Inhibiční aktivita vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE byla zanedbatelná. Výsledkem měření inhibice POP je $IC_{50} 0,79 \pm 0,4$ mM. Dále byla studována antimalarická aktivita, tedy působení na krevní jaterní stádium prvoka *Plasmodium berghei*. Měření cytotoxické aktivity bylo provedeno vůči buněčné linii Caco – 2 a vůči linii HT – 29. Zároveň byla měřena cytotoxicita vůči zdravým buňkám fibroblastů FHS-47int. Epimaritidin nebyl aktivní ani v jednom případě.

Klíčová slova: *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Amaryllidaceae, epimaritidin, cholinesterázy, POP, antimalarická aktivita, cytotoxická aktivita

ABSTRACT

Dohnalova A: Alkaloids of Amaryllidaceae family: isolation, structural identification, biological activity. I; Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2017, 64 p.

The Amaryllidaceae family includes bulbous, beautifully flowering plants that have been used for thousands of years in traditional medicine. The major chemical compounds found in this particular plant family are alkaloids, namely Amaryllidaceae alkaloids. Until now, more than 500 isoquinoline alkaloids have been discovered, which exhibit a diverse biological activity including antitumor and antibacterial. They are also able to inhibit acetylcholinesterase.

The aim of the diploma thesis was to process 34 kg of fresh bulbs of *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN and to prepare an alkaloidal extract. This extract was further divided by column chromatography to almost 500 fractions which were merged based on TLC into 27 subfractions. The subfraction No. 17 was selected for isolation of at least one pure alkaloid. Preparative TLC was used for the isolation. One pure compound was obtained in crystallic form which was then subjected to structural analysis by EI-MS and NMR methods. Further studies of biological activities were performed in cooperation with other departments.

The isolated alkaloid was identified as epimaritidine. Inhibitory activity of epimaritidine against erythrocyte AChE and serum BuChE was negligible. Epimaritidine showed weak POP inhibition activity (IC_{50} is 0.79 ± 0.4 mM). Antimalarial activity was also studied and epimaritidine effect was observed on blood liver stage of *Plasmodium berghei*. Measurements of cytotoxic activity were performed against the cell lines Caco - 2 and HT - 29. Simultaneously was measured cytotoxicity towards healthy cells of fibroblast FHS-47int. In all cases epimaritidine appeared as inactive.

Keywords: *Narcissus* cv. PROFESSOR Einstein, Amaryllidaceae, epimaritidine, cholinesterases, POP, antimalarial activity, cytotoxic activity